Aus dem Pathologischen Institut der Universität Marburg
Direktor: Prof. Dr. med. P. Gedigk

Licht- und Fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen über die Entstehung von Lipopigmenten nach einer einmaligen intravenösen Injektion einer Lebertranemulsion

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der gesamten Medizin
der hohen Medizinischen Fakultät
der Philipps-Universität Marburg

vorgelegt von

Helmut Wilhelm
aus Arolsen

Marburg 1968

Fotodruck: Erich Mauersberger, Marburg

Aus dem Pathologischen Institut der Universität Marburg
Direktor: Prof. Dr. med. P. Gedigk

Licht- und Fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen über die Entstehung von Lipopigmenten nach einer einmaligen intravenösen Injektion einer Lebertranemulsion

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der gesamten Medizin
der hohen Medizinischen Fakultät
der Philipps-Universität Marburg

vorgelegt von

Helmut Wilhelm
aus Arolsen

Marburg 1968

Fotodruck: Erich Mauersberger, Marburg

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Angenommen von der Medizinischen Fakultät
der Universität Marburg am: 9.7.1968
gedruckt mit Genehmigung der Fakultät
Dekan: Prof. Dr. med. R. SIEGERT
Referent: Prof. Dr. med. P. GEDIGK
Correferent: Priv.-Doz. Dr. med. G. KORB

Inhaltsverzeichnis

A. Einleitung 1

B. Methode und Versuchsanordnung

I. Zusammensetzung und Herstellung der Emulsion 3

II. Versuchsanordnung 4

III. Histologische Methoden 6

C. Befunde

I. Befunde der Vorversuche 9

II. Befunde der Hauptversuche 11

D. Diskussion

I. Wo werden Lipopigmente durch die intravenöse Injektion einer Lebertranemulsion erzeugt? 39

II. Welche Bedeutung kommt dem Lebertran in unseren Versuchen zu? 40

III. In welcher Weise ändern die Pigmentkörnchen im Laufe ihrer Entstehung und Alterung ihre fluoreszenzmikroskopischen und histochemischen Eigenschaften? 41

IV. Wie lassen sich diese Veränderungen der färberischen und histochemischen Eigenschaften der Pigmentgranula erklären? 48

V. Änderung des Pigmentgehaltes in den einzelnen Organen im Laufe der Versuchsdauer 50

VI. Welchem Typ der Lipopigmente ist unser durch intravenöse Lebertranzufuhr erzeugtes Pigment zuzuordnen? 52

VII. Die Verfettungsformen der übrigen Organe 53

E. Zusammenfassung 56

Literaturverzeichnis 58

A. Einleitung:

Die Entstehung von Lipopigmenten ist äußerst vielfältig. Ihr Vorkommen hat man bei den experimentell erzeugten diätetischen Lebercirrhosen, bei anoxischen Lebernekrosen, bei der Tetrachlorkohlenstoffvergiftung, bei der Sprue, bei Pankreas-Carcinomen, in lipophagen Granulomen, im Bereich von Corpora lutea der Ovarien, beim Vitamin E-Mangel, bei der sogenannten Lebertranpneumonie und bei subcutaner Applikation von verschiedenen Ölen, besonders von Lebertran, beobachtet (ausführliche Literatur bei ZOLLINGER 1953, GEDIGK und FISCHER 1958). Sogar die in vitro-Erzeugung dieser Pigmente ist von vielen Autoren beschrieben worden, so besonders bei GEDIGK und PIOCH 1965, HASS 1938 (2), ENDICOTT 1944, CASSELMAN 1951, HARTROFT 1951, PORTA 1963.
LILLIE, ASHBURN, SEBRELL, DAFT und LOWRY 1942 nannten als erste dieses Pigment wegen seiner wachsartigen Beschaffenheit Ceroid. In der Folgezeit wurde es als braungelbes, sudanophiles, säurefestes und in Fettlösungsmitteln unlösliches Pigment definiert (ZOLLINGER 1953, GEDIGK und FISCHER 1958). Dieses Fettpigment Ceroid brachte man schon sehr früh mit der Oxydation und Polymerisation von ungesättigten Fettsäuren in Zusammenhang (HASS 1938 (2), HASS 1939 (2), GEDIGK 1958, GEDIGK und PIOCH 1965).

In letzter Zeit wurden von amerikanischen Autoren (THOMPSON und Mitarb. 1958, 1960) ähnliche, in organischen Lösungsmitteln unlösliche Fettpigmente beschrieben, die nach intravenöser Applikation von Fettemulsionen in verschiedenen Organen bei Mensch und Tier auftraten. Sie nannten diese Pigmente entsprechend i.v.-Fettpigmente. Sie charakterisierten dieses Pigment zwar in seinen chemischen und histochemischen Eigenschaften und setzten es auch in Beziehung zu den Fettinfusionen, speziell zu ungesättigten Fettsäuren. Sie

machten aber keine genaueren Angaben über seinen Entstehungsmechanismus, d. h. die Transformation der ungesättigten Fettsäuren zu Pigmentstrukturen und deren weitere Entwicklung, in deren Verlauf sich - wie GEDIGK (1958) zeigen konnte - die morphologischen, histochemischen und färberischen Eigenschaften entscheidend ändern.

In Anbetracht dieser früheren und älteren Arbeiten liegt unseren neueren Experimenten folgender Leitgedanke zugrunde: Lassen sich nach intravenöser Fettapplikation Lipopigmente erzeugen? Kann man diese Pigmente von ihren frühesten Entwicklungsstadien an verfolgen und ihre Umwandlung im Laufe ihrer Alterung mit fluoreszenzmikroskopischen und histochemischen Methoden erfassen und charakterisieren, so wie es GEDIGK und Mitarbeiter (1958, 1959, 1964, 1965) bei der hämorrhagischen Fettgewebsnekrose, beim Vitamin E-Mangel und in lipophagen Granulomen gezeigt und beschrieben haben?

Überblickt man die Literatur, so bietet sich für unsere Fragestellung besonders als Fettstoff der Lebertran an, da mehrere Autoren mit Hilfe des Fischtranes auf verschiedenste Weise Lipopigmentstrukturen erzeugt haben, z. B. PINKERTON 1928 und GRAEF, KAUFMANN, KAPLAN 1938 durch tracheale Applikation in der Lunge, HASS 1938, HASS 1939, HARTROFT 1951, GEDIGK und PIOCH 1965 durch subcutane Injektion in der Subcutis, GEDIGK und PIOCH 1965 in vitro durch Auftragen von Lebertran oder einer Lebertranemulsion auf einen Objektträger.

Aber auch von der chemisch-analytischen Seite her war diesem Fettstoff der Vorzug zu geben. Frischer Lebertran enthält ungefähr 85 % Glyceride ungesättigter - und nur etwa 15 % Glyceride gesättigter Fettsäuren (WOOD und YASUTAKE 1956). Da der Grad der Äthylenbindungen für die Pigmententstehung - wie schon kurz angedeutet wurde - von ausschlaggebender Bedeutung ist, entschlossen wir uns für dieses Fettgemisch, stellten davon eine Emulsion her und injizierten sie Ratten intravenös.

B. Methode und Versuchsanordnung:

I. Zusammensetzung und Herstellung der Emulsion

1. Zusammensetzung:

Voraussetzung für unsere Versuchsserie und deren Fragestellung war die Herstellung einer nicht nur in vitro sondern auch in vivo stabilen Emulsion. Die Beständigkeit einer Emulsion ist die Hauptbedingung für ihre Haltbarkeit und ihre konstante Wirkungsweise im Organismus. Um stabile Emulsionen zu erhalten, ist ein Zusatz von Emulgatoren unbedingt notwendig. Um jedoch Nebenwirkungen der Emulgatoren möglichst auszuschalten, ist es wünschenswert, deren Konzentration in dem Öl-Wassergemisch gering zu halten. Für unsere Emulsion wählten wir daher folgende Zusammensetzung:

a) Lebertran 10 %
b) Lecithin 1 %
c) Aq. dest. ad 100

Wir verwandten frischen, von der ANDRAE-NORIS-ZAHN AG Frankfurt direkt aus Norwegen bezogenen Lebertran, der den Bestimmungen des DAB 6 genügte. Die genaue chemische Analyse unseres Lebertranes ergab folgende Daten:

Freie Fettsäuren: 0,3 %
Vitamin A : 910 I. E. pro Gramm
Vitamin D : 85 I. E. pro Gramm
Säurezahl : 0,49
Jodzahl : 151,4
Verseifungszahl : 188,5

Als Emulgator benutzten wir "Lecithin ex ovo, reinst" von der Firma Merck. Als Dispersionsmittel gebrauchten wir einfaches destilliertes Wasser.

2. Herstellung:

17,8 g Aq. dest., 2,0 g Lebertran und 0,2 g Lecithin wurden mit Hilfe eines "Ultra Turrax" (Drehstab mit einer Umdrehungszahl von 24 000/min) 1 1/2 min voremulgiert. Die Tröpf-

chengröße der Fettanteile wurde danach okularmikrometrisch bestimmt und betrug ungefähr 1 - 8 µ im Durchmesser. Anschließend wurden 1,5 ml dieses Öl-Wassergemisches 10 min lang beschallt (Beschallgerät der Firma Siemens mit einer Leistung von 12 KHz). Die Emulsion besaß nun eine Fetttröpfchengröße von 0,5 - 2 µ im Durchmesser und war Tage bis Wochen stabil. Die Stabilität der Emulsion wurde folgendermaßen geprüft: In einem Reagenzglas wurden zu 1 ml heparinisiertem Rattenblut 2 Tropfen obiger Lebertranemulsion gegeben. Dieses Blutfettgemisch bewahrten wir im Wärmeschrank bei 37°C auf und entnahmen nach verschiedenen Stunden und Tagen Proben, die wir mikroskopisch untersuchten. Dabei konnten wir mikroskopisch keine Konfluenz der kleinen zu großen Fetttropfen und keine Traubenbildungen der kleinen Fetttröpfchen feststellen. Die Eigenbeweglichkeit der Fetttröpfchen (Braun'sche Molekularbewegung) war darüber hinaus auch noch nach Tagen erhalten.

II. Versuchsanordnung

1. Vorversuche:

Um eventuelle Nebenreaktionen des Emulgators erkennen oder ausschließen zu können, spritzten wir in gleicher Weise wie in der Hauptversuchsserie Ratten intravenös Lecithin.
Ein Tier erhielt 2 ml einer 1%igen Lecithinemulsion (1 g Lecithin auf 100 g Aq. dest.) und wurde nach 2 Tagen getötet.
Zwei Tiere erhielten je 2 ml einer 10%igen Lecithinemulsion und wurden nach 2 und 4 Tagen getötet.
In gleicher Weise erhielt 1 Tier, welches nach 15 Std. getötet wurde, eine intravenöse Injektion von 4 ml destilliertem Wasser, um auch eine mögliche Nebenwirkung des Dispersionsmittels auszuschließen.

Tabelle 1

Vorversuche:

Zahl d. Tiere	Art d. Stoffes	Konzentration	getötet nach
1	2 ml Lecithin	1 %	2 Tagen
1	2 ml Lecithin	10 %	2 Tagen
1	2 ml Lecithin	10 %	4 Tagen
1	4 ml Aq. dest.	-	15 Std.

2. Hauptversuche:

4 ml der 10%igen stabilisierten, nicht isotonischen Lebertran-Wasser-Emulsion (O/W-Emulsion) injizierten wir während einer leichten Äthernarkose in die Schenkelvene von jungen weiblichen Wistar-Ratten mit einem durchschnittlichen Gewicht von 200 - 250 g; hierzu war ein kleiner Schenkelschnitt notwendig. Ein Versuchs- und jeweils ein Kontrolltier wurden nach unterschiedlich langen Zeiträumen (s. Tabelle 2) durch Genickschlag getötet.

Tabelle 2

Übersicht über die Versuchstiere:

Zahl d. Tiere	Lebertranmenge	getötet nach
2	1 x 4 ml	5 min
1	1 x 4 ml	10 min
2	1 x 4 ml	30 min
2	1 x 4 ml	60 min
2	1 x 4 ml	2 Std.
2	1 x 4 ml	4 Std.
2	1 x 4 ml	10 Std.
1	1 x 4 ml	15 Std.
1	1 x 4 ml	24 Std.
1	1 x 4 ml	48 Std.
1	1 x 4 ml	7 Tagen
1	1 x 4 ml	4 Wochen
2	1 x 4 ml	6 Wochen

III. Histologische Methoden

Sofort nach dem Tode wurden Herz, Lunge, Leber, Milz, Nieren und Gehirn dem Versuchs- und Kontrolltier entnommen. Gleiche Organe wurden unfixiert zusammen aufgefroren und im Kryostaten mit einer Schichtdicke von 10 µ geschnitten.

1. Lichtmikroskopische Untersuchungen:

Unfixierte Kryostat-Schnitte von den oben angeführten Organen wurden in üblicher Weise mit Hämatoxylin-Eosion und Sudan III/IV nach KAY und WHITEHEAD (GEDIGK und TOTOVIĆ 1964) gefärbt.

Als histochemische Reaktionen für Lipopigmente wurden zusätzlich die PAS-Reaktion mit und ohne vorheriger Diastasebehandlung und die Färbung nach ZIEHL-NEELSEN durchgeführt.

a) PAS-Reaktion:

Normalerweise weist man mit der PAS-Reaktion Kohlenhydrate nach, da durch Perjodsäure die α-Glykolgruppen in Kohlenhydraten und kohlenhydrathaltigen Verbindungen unter Spaltung der Kohlenstoff-Kohlenstoffbindung oxydiert werden. Die dabei entstehenden Aldehyde stellt man mit einem Aldehydreagenz wie dem Schiff'schen Reagenz dar (GEDIGK, P.: Histochemische Darstellung von Kohlenhydraten; Klin. Wschr. (1952), GEDIGK und TOTOVIĆ (1964)).

Der positive Ausfall der PAS-Reaktion ist aber für das Vorhandensein von Kohlenhydraten und kohlenhydratähnlichen Substanzen nicht beweisend. Bei vorsichtiger Oxydation ungesättigter Fettsäuren lagern sich an die Äthylengruppen Hydroxylgruppen an, die sich bei der PAS-Reaktion genauso verhalten wie die benachbarten Hydroxylgruppen von Polysacchariden (GEDIGK 1952, GEDIGK und FISCHER 1958, 1959, GEDIGK und PIOCH 1965, GEDIGK und TOTOVIĆ 1964, DEBUCH und CLARA in

Handbuch d. Histochemie 1965). Da Lipopigmente reichlich ungesättigte Fettsäuren enthalten, kann man somit durch die PAS-Reaktion Lipopigmente anfärben und gegebenenfalls nachweisen.

Die unfixierten Schnitte wurden mit der PAS-Reaktion nach den Angaben von GEDIGK und TOTOVIĆ (1964) gefärbt.

Um in der Leber eine positive PAS-Reaktion tatsächlich auf die Fettstoffe beziehen zu können, mußte erst das Glykogen aus den Leberzellen herausgelöst werden. Dazu benutzten wir Diastase, die das Glykogen aus Leberschnitten entfernt. Der Test wurde ebenfalls nach den Angaben von GEDIGK und TOTOVIĆ (1964) durchgeführt.

b) Prüfung der Säurefestigkeit nach Ziehl-Neelsen:

Wir wandten die Ziehl-Neelsen-Methode für säurefeste Lipofuscine nach den Angaben von PEARSE (1954) an. Dabei stellen sich säurefeste Lipofuscine hell bis dunkelrot dar, während Lipoproteine rosa erscheinen.

c) Eisenreaktion:

An einigen Schnitten der Leber und Milz wurden auch Eisenreaktionen vorgenommen, um die entstandenen Lipopigmente neben den anderen Lipopigmentreaktionen vom Haemosiderin abgrenzen zu können. Die Reaktionen wurden mit der Turnbullblau-Methode nach den Angaben von GEDIGK und TOTOVIĆ (1964) ausgeführt.

2. Fluoreszenzmikroskopische Methoden:

Da Lipopigmente eine ausgeprägte Primärfluoreszenz (Eigenfluoreszenz) und Lipide nach Fluorochromierung eine sekundäre Fluoreszenz zeigen, kamen auch diese Methoden zur Anwendung (GEDIGK und TOTOVIĆ 1964, DEBUCH und CLARA 1965).

Die Methode der Fluorochromierung bei Lipiden hat gegenüber den üblichen Fettfärbeverfahren den Vorteil, daß wässrige und sehr stark verdünnte Lösungen verwendet werden können, die auch sehr kleine Lipidtröpfchen zur Darstellung gelangen lassen und sie nicht aus dem Schnitt herauslösen. Als Fluoreszenzmikroskop verwendeten wir ein Zeiss-Standard-Mikroskop, das mit einem HBO 200 Quecksilberhöchstdruckbrenner ausgerüstet war unter Verwendung von BG 12 Erregerfiltern und OG 1 Sperrfiltern.

a) Primäre Fluoreszenz:

Frische, unfixierte und mit Eukitt eingedeckte Kryostatschnitte wurden ungefärbt unter dem Fluoreszenzmikroskop beurteilt. Lipopigmente fluoreszieren dabei in einem weißlich-gelben, gelb-bräunlichen, goldbraunen oder braunen Farbton.

b) Sekundäre Fluoreszenz:

Fluorochromierung der Schnitte mit Astraphosphin in folgender Weise:

1) Unfixierte, frische Schnitte kurz in einer Mischung von Aq. dest. und Leitungswasser 1:1 wässern.
2) Fluorochromierung mit einer Astraphosphinlösung 1:1000, 10 min.
3) Wässern in einer Mischung von Aq. dest. und Leitungswasser 1:1, 5 - 10 min. Danach in Wasser eindecken und mit Paraffin umranden.

Die Lipidtröpfchen stellen sich in einer intensiven Fluoreszenz von hellgelber bis hellgrüner Farbe dar.

Übersicht über die angewandten histochemischen Reaktionen und Färbungen:

Leber: Haematoxylin-Eosin (H.E.), Sudan, PAS, PAS-Diastase, Ziehl-Neelsen (Z.N.), Astraphosphin (A.P.), Eigenfluoreszenz (E.Fl.)
Milz: H.E., Sudan, PAS, Z.N., A.P., E.Fl.
Lunge: H.E., Sudan, PAS, Z.N., A.P., E.Fl.
Niere: H.E., Sudan, PAS, A.P.
Herz u. Gehirn: als Übersichtsfärbungen H.E., Sudan, A.P.

C. Befunde:

Bevor die Befunde ausführlich beschrieben werden, möchten wir darauf hinweisen, daß es manchmal auch bei starker Vergrößerung erhebliche Schwierigkeiten bereitet, am Gefrierschnitt zu entscheiden, ob sich die Fetttröpfchen intra- oder extrazellulär befinden. In solchen Fällen wird dies in der Befundbeschreibung angegeben.

Mit zunehmender Versuchsdauer werden diese Schwierigkeiten geringer, weil dann die genauere morphologische Lokalisation der Fettstoffe bzw. der aus ihnen entstandenen Pigmente möglich ist.

I. Befunde der Vorversuche:

Die Befunde der Vorversuche (Injektion von Lecithin und Wasser) stimmen in allen wesentlichen Punkten miteinander überein. Nur in quantitativer Hinsicht unterscheiden sie sich etwas voneinander, indem die Astraphosphin- und Eigenfluoreszenz bei den beiden höheren Lecithinkonzentrationen (s. Tabelle 1) stärker ausfallen. Aus diesem Grund erscheint es sinnvoll, die einzelnen Befunde zusammen zu besprechen. Auch die Ratte, der 4 ml Aq. dest. injiziert worden waren, zeigte keine abweichenden Organbefunde.

1. Leber:
   a) H.E.: Normales Bild.
   b) A.P.: Besonders in der Läppchenperipherie zeigt sich eine sehr geringe, fleckförmig angeordnete feintropfige Verfettung der Parenchymzellen.
   c) E.Fl.: Diffuse hell-gelbliche Eigenfluoreszenz der Parenchymzellen. Nach längerer U.V.-Bestrahlung schlägt die hell-gelbliche Eigenfluoreszenz in einen gelb-bräunlichen Farbton um. In den Kupffer'schen Sternzellen läßt sich kein fluoreszierendes Material nachweisen.
   d) Sudan: Mit dieser Fettfärbung ist kein sudanpositives Material in der Leber aufzufinden.

e) PAS: Normaler Glykogengehalt des Leberläppchens.
PAS-Diastase: Glykogen läßt sich nicht mehr nachweisen; aber auch andere PAS-positive Substanzen sind weder in den Parenchymzellen noch in den Kupffer'schen Sternzellen vorhanden.

2. Milz:
a) H.E.: Normales histologisches Bild.
b) A.P.: Das Cytoplasma der Reticulumzellen der roten Pulpa besitzt eine schwach gelb-bräunliche Sekundärfluoreszenz.
c) E.Fl.: Ähnlich wie bei Astraphosphin ist auch im Cytoplasma der Reticulumzellen der roten Pulpa eine Eigenfluoreszenz von gelb-bräunlichem Farbton vorhanden.
d) Sudan: Sudanpositives Material läßt sich weder in der roten Pulpa noch in den Follikeln nachweisen.
e) PAS: Mit dieser Methode lassen sich keine fremden Strukturen erkennen.

3. Lunge:
a) H.E.: Keine von der Norm abweichenden histologischen Veränderungen.
b) A.P.: Das Cytoplasma einiger Alveolarepithelien fluoresziert schwach gelb-bräunlich.
c) E.Fl.: Auch eine in Farbe und Intensität ähnlich aussehende gelb-bräunliche Eigenfluoreszenz ist im Cytoplasma einiger Alveolarepithelien nachweisbar.
d) Sudan: In diesen Schnitten sind keine anfärbbaren Fettsubstanzen vorhanden.
e) PAS: Normales Bild. Fremde PAS-positive Substanzen lassen sich nicht darstellen.

4. Niere:) In diesen Organen lassen sich weder eine Eigen-
5. Herz:) und Sekundärfluoreszenz noch sudanpositive Substan-
6. Gehirn:) zen nachweisen. Auch die PAS-Reaktion und die Färbung mit Haematoxylin-Eosin ergeben bei diesen Organen ein normales Bild.

Zur Kontrolle der fluoreszenzmikroskopischen Befunde in Leber, Milz und Lunge wurde ein Tropfen der Lecithinemulsion auf einen Objektträger gebracht, mit einem Deckgläschen versehen und unter dem Fluoreszenzmikroskop betrachtet. Die Lecithintröpfchen besaßen die in Farbton und Intensität gleiche Eigenfluoreszenz, die bei den betreffenden Organen beschrieben wurde.

In gleicher Weise wurde ein Tropfen unserer 10%igen Lebertranemulsion auf seine Eigenfluoreszenz untersucht. Die Fetttröpfchen strahlten eine ganz schwache bräunliche Eigenfluoreszenz aus, die aber längerer U.V.-Bestrahlung nicht standhielt und schon nach einer Minute verschwunden war.

II. Befunde der Hauptversuche

Nach 5 min:

1. Leber:
   a) H.E.: Normales Bild.
   b) A.P.: Bei schwacher Vergrößerung erkennt man eine diffuse, feintropfige Verfettung der Leber. Die Verfettung ist in den peripheren Läppchenanteilen betont.

      Bei mittlerer und starker Vergrößerung stellen sich in den Lichtungen der Blutgefäße und der Sinusoide zahlreiche kleinste Fettpartikelchen - im Durchschnitt 0,5 - 1 µ groß - dar, die oft kranzartig der Erythrocytenmembran anhaften.
      Die Parenchymzellen sind in weiten Zonen - besonders peripher und intermediär - perivasal verfettet. Ab und zu sind Fetttropfen bis in den perinukleären Raum vorgedrungen.
      Daneben läßt sich auch eine Verfettung der Kupffer'schen Sternzellen nachweisen.
   c) E.Fl.: Eigenfluoreszierendes Material stellt sich nicht dar.

d) Sudan: Bei makroskopischer Betrachtung des Schnittes fällt eine deutliche gelbe Verfärbung der Versuchsleber gegenüber der Kontrolleber auf. Mikroskopisch lassen sich aber nicht in dem Ausmaß wie nach Fluorochromierung mit A.P. sudanophile Lipidtröpfchen in den Leber- und den Kupffer'schen Sternzellen nachweisen.

e) PAS: Normaler Glykogengehalt.
PAS-Diastase: Nach Diastasebehandlung sind die Glykogenkörnchen vollständig aus dem Schnitt herausgelöst. Kein Anhalt für PAS-positive Fettsubstanzen.

f) Z.N.: Es läßt sich kein säurefestes Material nachweisen.

2. Milz:

a) H.E.: Die Follikelrandzone erscheint im Vergleich zum Kontrollschnitt aufgelockert. Sonst stellt sich ein normales histologisches Bild dar.

b) A.P.: Bei schwacher Vergrößerung sieht man eine starke feintropfige Verfettung der perifollikulären Zone und leichte fleckförmige Verfettung der roten Pulpa.

Follikel: Die meisten Follikel und ihre Zentralarterien sind fettfrei. Ganz vereinzelt trifft man jedoch auch hier auf feinste, extrazellulär liegende Lipidtröpfchen.
Follikelrandzone: Ausgedehnte fein- bis mittelgroßtropfige Verfettung dieser Zone mit scharfer Begrenzung zum Follikel und unscharfer Begrenzung zur roten Pulpa hin. Die Fetttröpfchen liegen zu diesem Zeitpunkt extrazellulär.

Rote Pulpa: Die rote Pulpa zeigt eine leichte, mehr fleckförmige, von der Follikelrandzone ausgehende Verfettung. Es fällt auf, daß die Tröpfchengröße hier feiner als in der Follikelrandzone ist. Auch hier scheinen die Lipidtröpfchen extrazellulär zu liegen.

c) E.Fl.: In den Follikeln der Versuchs- und Kontrolltiere finden sich im Cytoplasma reticulärer Speicherzellen gelbliche, intensiv eigenfluoreszierende, grob-granuläre und schollige Partikel, welche PAS-positiv und säurefest sind sowie eine negative Eisenreaktion geben.

Diese Lipopigmente fanden wir während der gesamten Versuchsdauer in den Milzfollikeln der Versuchs- und Kontrolltiere in gleicher Art und Weise. Da es sich hierbei offenbar um in den Milzfollikeln der Ratte normal vorkommende Lipopigmentstrukturen handelt, wird auf eine weitere Beschreibung bei den übrigen Versuchsergebnissen verzichtet.

d) Sudan: In der Milz stellt sich nur die Knötchenrandzone verfettet dar; die einzelnen Fetttröpfchen besitzen eine ausgeprägte Sudanophilie und scheinen extrazellulär zu liegen.

e) PAS: Kein Unterschied der Schnitte von Versuchs- und Kontrollmilz.

f) Z.N.: Kein Unterschied der Schnitte von Versuchs- und Kontrollmilz.

3. Lunge:

a) H.E.: Normales Bild.

b) A.P.: In den Lichtungen der größeren Lungengefäße und der Kapillaren ist feintropfiges Fett nachweisbar. Im Bereich der peribronchial verlaufenden Lymphwege - teils in ihrer Wand, teils in den Lichtungen - findet man gleichfalls feintropfige Lipidablagerungen.

c) E.Fl.: Kein eigenfluoreszierendes Material nachweisbar.

d) Sudan: Es bestehen keine Abweichungen zu dem obigen Astraphosphin-Befund.

e) PAS: Kein Unterschied zwischen Versuchs- und Kontrolllunge.

f) Z.N.: Kein säurefestes Material darstellbar.

4. Niere:

a) H.E.: Normales Bild.

b) A.P.: In den Lichtungen der Arterien, der Arteriolen, der intertubulären Kapillaren und der Glomerulaschlingen sind zahlreiche feinste Lipidtröpfchen enthalten. Dagegen läßt sich weder in den Lichtungen noch im Epithel der Tubuli und Sammelrohre Fett nachweisen.

c) Sudan: Keine Abweichungen zu den fluoreszenzmikroskopischen Ergebnissen.
d) PAS: Diese Färbung ergibt keine Besonderheiten.

5. Herz:
a) H.E.: Normales Gewebsbild.
b) A.P.: Zahlreiche feine Lipidtröpfchen sind in den Lichtungen der Kranzarterien und in den Ventrikeln nachweisbar.
c) Sudan: Sudanophile Tröpfchen stellen sich intravasal dar.

6. Gehirn:
a) H.E.: Keine pathologischen Veränderungen.
b) A.P. Die Lichtungen der Gefäße enthalten feinste Lipidtröpfchen.
c) Sudan: Auch mit Sudan sind in den Gefäßen Lipidtröpfchen anfärbbar.

Nach 10 min:

Die Organbefunde dieses Versuches unterscheiden sich nicht wesentlich von den Ergebnissen nach 5 min.

Nach 30 min:

1. Leber:
a) H.E.: Die Sinusoide erscheinen besonders in den peripheren Läppchenanteilen verbreitert. Sonst normales Bild.
b) A.P.: Ausgedehnte feintropfige Verfettung der Parenchymzellen. Unveränderte periphere und intermediäre Läppchenbetonung. Die perivasale und perinukleäre Verfettung der Leberzellen ist im Vergleich zu den beiden vorhergehenden Versuchstieren weiter fortgeschritten. Auch die Kupffer'schen Sternzellen sind verfettet.
c) E.Fl.: Kein eigenfluoreszierendes Material nachweisbar.

d) Sudan: Keine Abweichungen zu den Astraphosphin-Ergebnissen.

e) PAS: } Keine Abweichungen zu den Ergebnissen
PAS-Diastase: } der vorangegangenen Versuche.

f) Z.N.: Säurefestes Material gelangt nicht zur Darstellung.

2. Milz:

a) H.E.: Die äußere Follikelzone (Knötchenrandzone) ist wie nach 5 und 10 min stark aufgelockert. Sonst normales Bild.

b) A.P.: Bei schwacher Vergrößerung erkennt man eine starke Verfettung der perifollikulären Zone mit scharfer Begrenzung zum Follikel und diffuser Aussaat in die rote Pulpa.

Follikel und Follikelrandzone: In den Zellen der Follikel und den Lichtungen der Follikelarterien kommen keine Fetttröpfchen zur Darstellung. In der Follikelrandzone haben sich zahlreiche Fetttröpfchen angefärbt; diese scheinen extrazellulär zu liegen und zeigen eine intensive hell-gelbliche Fluoreszenz.

Rote Pulpa: Die rote Pulpa ist stärker verfettet als nach 5 und 10 min. Die Verfettung geht deutlich von der perifollikulären Zone aus. Sie ist fleckförmig, zum Teil konfluierend. Die Lipidtröpfchen sind hier im Durchmesser kleiner als in der Follikelrandzone. Teils liegen sie in den Blutgefäßen der roten Pulpa, teils intrazellulär in größeren, insgesamt etwas heller fluoreszierenden Zellen, und zwar in Reticulumzellen. Die Fluoreszenz der intrazellulären Lipidtröpfchen erscheint etwas matter als perifollikulär.

c) E.Fl.: Keine Abweichungen zu den vorausgegangenen Versuchsergebnissen.

d) Sudan: Kein Unterschied zu den fluoreszenzmikroskopischen Befunden. Die Fetttropfchen sind deutlich sudanophil.

e) PAS: Insgesamt zeigt sich eine schwach PAS-positive Verstärkung der Reticulumzellen der roten Pulpa gegenüber der roten Pulpa der Kontrolltiere.

f) Z.N.: Keine Unterschiede zu den vorausgegangenen Versuchsergebnissen.

3. Lunge:
   a) H.E.: Normales Bild. Kein Unterschied zu den vorausgegangenen Ergebnissen.
   b) A.P.: Es stellen sich feintropfige Fettablagerungen intravasal und in der Wand und der Lichtung der peribronchial verlaufenden Lymphgefäße dar. Mehrere herdförmig angeordnete Alveolarepithelien sind mit Fetttropfen beladen.
   c) E.Fl.: Kein eigenfluoreszierendes Material nachweisbar.
   d) PAS: } Bei diesen Färbungen ergaben sich normale Bil-
   e) Z.N.: } der. Keine Unterschiede zu den vorausgegangenen Ergebnissen.

Nach 1 Std.:

1. Leber:
   a) H.E.: In den Parenchymzellen findet man vereinzelt kleine und mittelgroße Vakuolen.
   b) A.P.: Die Parenchymzellen sind diffus feintropfig verfettet. In den Blutgefäßen trifft man mehrfach auf Erythrocyten, an deren Membran feinste Lipidtröpfchen haften. In den Leberzellen stellen sich kleine, perivasal und perinukleär gelegene Fetttröpfchen dar. Gleichfalls läßt sich Fett in den Kupffer'schen Sternzellen nachweisen.
   c) E.Fl.: Kein eigenfluoreszierendes Material nachweisbar.
   d) Sudan: Die peripheren Läppchenanteile sind verfettet. Mit Sudan haben sich allerdings nur die größeren Fetttropfen angefärbt; daher ist bei dieser Färbung die nachweisbare Verfettung wesentlich geringer als bei der Darstellung mit Astraphosphin.
   e) PAS: In der Peripherie und der intermediären Zone des Läppchens ist kein Glykogen nachweisbar.
   PAS-Diastase: Schwach PAS-positive kleinere und größere Tröpfchen stellen sich über den gesamten Schnitt verteilt in den Parenchymzellen dar. In den Kupffer'schen Sternzellen findet man dagegen dichteres, granuläres, PAS-positives Material. Sehr deutlich sind diese stärker

PAS-positiven roten Partikel in Histiocyten des portalen Feldes.

f) Z.N.: Mit dieser Methode färbt sich kein säurefestes Material an.

Milz:

a) H.E.: Kleinere und größere Vakuolen findet man betont extrazellulär in der Follikelrandzone und fleckförmig angeordnet intrazellulär im Cytoplasma der Reticulumzellen. Durch die perifollikulär liegenden Vakuolen ist die äußere Follikelschicht wiederum aufgelockert, aber noch deutlich abgrenzbar.

b) A.P.: Bei schwacher Vergrößerung erkennt man eine erhebliche, stark hervortretende Verfettung der Follikelrandzone und diffuse Verfettung der roten Pulpa. In den Lichtungen der Trabekelarterien findet man eine mäßig starke Lipämie.

Follikel und Follikelrandzone: Bei starker Vergrößerung besitzen die Lipidtröpfchen der Follikelrandzone eine intensive, strahlend hell-gelbliche Fluoreszenz und liegen zum größten Teil extrazellulär. Die Follikel und die Lichtungen der Follikelarterien sind fettfrei.

Rote Pulpa: Die Lipidtröpfchen in der roten Pulpa zeigen zum großen Teil eine sehr schwache, matte, braun-gelbliche Fluoreszenz. Die Tröpfchen sind kleiner als in der Follikelrandzone und liegen zum größten Teil im Cytoplasma der Reticulumzellen.

Siehe Tabelle 3:

Tabelle 3

Unterschiedliches Verhalten der Lipidtröpfchen in der Follikelrandzone und der roten Pulpa

L i p i d t r ö p f c h e n

	Sekundär-Fluoreszenz (Astraphosphin)	Tröpfchengröße	Lage
Follikelrandzone	hell-gelb, intensiv	groß (ca. 2 µ)	extrazellulär
Rote Pulpa	gelb-bräunlich, schwach	klein (ca.0,5-1 µ)	intracytoplasmatisch (Reticulumzellen)

c) E.Fl.: Kein eigenfluoreszierendes Material in der roten Pulpa nachweisbar.

d) Sudan: Die rote Pulpa ist unter Aussparung der Milz-Follikel diffus verfettet. Dabei finden sich die Lipidtröpfchen in der Follikelrandzone hauptsächlich extrazellulär, während sie in der roten Pulpa hauptsächlich intrazellulär im Cytoplasma der Reticulumzellen anzutreffen sind. Ihre Sudanophilie ist überall gleich gut erhalten.

e) PAS: Die rote Pulpa ist fleckförmig bis diffus mit PAS-positiven Tröpfchen durchsetzt. Eine deutliche perifollikuläre Betonung liegt auch hier vor mit scharfer Begrenzung zum Follikel und unscharfer Begrenzung zur roten Pulpa hin.
Bei starker Vergrößerung sieht man, daß perifollikulär die Tröpfchen vermehrt extrazellulär liegen, während interfollikulär stärker rote, PAS-positive, fein- und grobgranuläre Partikel intrazellulär in den Reticulumzellen anzutreffen sind. Dieser Befund gleicht in Verteilung des PAS-positiven Materials völlig der Fettverteilung bei Astraphosphin.

f) Z.N.: Kein Unterschied zwischen der Milz von Versuchs- und Kontrolltier.

3. Lunge: } Diese Organe weichen bei den verwendeten Färbungen
4. Niere: } nicht von den vorangegangenen Versuchsergebnissen
5. Herz: } ab.
6. Gehirn: }

Nach 2 Std.:

Sämtliche Färbungen fallen an den Organen Leber, Milz, Lunge, Niere, Herz und Gehirn in gleicher Weise aus wie nach einer Stunde; auch das übrige feingewebliche Bild ist übereinstimmend.

Nach 4 Std.:

1. Leber:
   a) H.E.: Außer intrazellulären Fettvakuolen im Cytoplasma der Parenchymzellen besteht kein besonderer Befund.
   b) A.P.: Bei schwacher Vergrößerung fällt eine starke feintropfige Verfettung der Leberzellen auf. In den Lichtungen der Gefäße und der Sinusoide findet man eine feintropfige Lipämie.
   Bei starker Vergrößerung ist das Cytoplasma der Parenchymzellen in großem Ausmaß diffus verfettet. Die intrazellulären Fetttröpfchen zeigen eine schwächere Sekundär-Fluoreszenz als die in den Lumina der Gefäße. Daneben besteht Verfettung der Kupffer'schen Sternzellen.
   c) E.Fl.: Die Leber zeigt über den ganzen Schnitt verteilt eine schwach gelbliche Eigenfluoreszenz der Kupffer'schen Sternzellen. Eigenfluoreszierendes Material läßt sich dagegen nicht in den Parenchymzellen nachweisen.
   d) Sudan: Die Parenchymzellen sind fein- und mittelgroßtropfig verfettet; auch die Kupffer'schen Sternzellen haben Fetttröpfchen gespeichert.
   e) PAS: Massiver peripherer und intermediärer Glykogenschwund. PAS-Diastase: Die Kupffer'schen Sternzellen und Histiocyten der portalen Felder enthalten teils schwach rosa, teils stark rote, PAS-positive größere und kleinere Partikel.
   f) Z.N.: In einigen Kupffer'schen Sternzellen und Makrophagen des portalen Bindegewebes stellt sich säurefestes, schwach rosa-rotes Material dar. In den Kontrollschnitten ist dieses Material nicht zu finden.

2. Milz:
   a) H.E.: Die Follikelrandzone erscheint aufgelockert; sonst kein wesentlicher Befund.
   b) A.P.: Mit der Lupenvergrößerung fällt eine erhebliche diffuse Verfettung der roten Pulpa mit einer Betonung der Follikelrandzone auf, während die Follikel fettfrei erscheinen. Die Fluoreszenzintensität der Lipidtröpfchen ist weitaus schwächer als nach 1 und 2 Stunden.

Follikel und Follikelrandzone: Auffallend ist, daß zwei stärker verfettete Zonen den Follikel umgeben. Die äußere Zone, welche mehr Fett enthält als die innere, entspricht der außeren Begrenzung der Follikelrandzone und somit dem Übergang zur roten Pulpa. Hier liegen viele Lipidtröpfchen extrazellulär und zeigen eine intensive gelbliche Fluoreszenz. Der innere Fettsaum entspricht offenbar der inneren Begrenzung der Knötchenrandzone. Der Raum zwischen diesem auffallenden "Fettdoppelsaum" - die eigentliche Follikelrandzone - ist nur schwach und äußerst feintropfig verfettet. Hier ist die genaue Lokalisation der Lipidtröpfchen schwierig. Sie scheinen im Cytoplasma reticulärer Speicherzellen zu liegen.

Rote Pulpa: Die Reticulumzellen der roten Pulpa besitzen durch schwach fluoreszierende Lipidtröpfchen eine gelbbräunliche Farbe.

c) E.Fl.: Es stellt sich granuläres, gelblich eigenfluoreszierendes Material in den Reticulumzellen der roten Pulpa dar.
d) Sudan: Diffuse Verfettung der Reticulumzellen der roten Pulpa mit Ausbildung eines "Fettdoppelsaumes" genau wie bei Astraphosphin.
e) PAS: Die Mehrzahl der Reticulumzellen der roten Pulpa enthält kleinere und größere, schwächer und stärker PAS-positive Granula und schollige Elemente.
f) Z.N.: Die Reticulumzellen der roten Pulpa haben teils rosa, teils rot gefärbtes säurefestes Material in Form von kleinen Tröpfchen oder Granula gespeichert.

Lunge:

a) H.E.: Ohne Besonderheiten.
b) A.P.: Mit mittlerer Vergrößerung zeigt es sich, daß intravasal, in der Wand und der Lichtung der peribronchialen Lymphgefäße sowie im Cytoplasma von Alveolarepithelien und Histiocyten des Interstitiums Lipidtröpfchen auftreten.

c) E.Fl.: Eine schwach gelbliche granuläre Eigenfluoreszenz tritt im Cytoplasma einiger Alveolarepithelien und Histiocyten des Interstitiums auf.
d) Sudan: Keine Abweichungen zu dem Astraphosphin-Befund.
e) PAS: PAS-positives granuläres Material ist in einigen Alveolarepithelien und Histiocyten des Interstitiums enthalten.
f) Z.N.: In den gleichen Zellen stellt sich auch mit dieser Methode schwach rosa-rotes, säurefestes Material dar. Die Kontrollschnitte enthalten dagegen kein säurefestes Material.

4. Niere:) Diese Organe weichen bei den verwendeten Färbungen
5. Herz:) nicht von den vorangegangenen Versuchsergebnissen
6. Gehirn:) ab.

Nach 10 Std.:

1. Leber:
a) H.E.: In der Leber findet man disseminiert angeordnete, insgesamt jedoch nicht sehr ausgebildete Einzelzell- und Gruppennekrosen, und zwar bevorzugt in der Läppchenperipherie. Sie sind durch eine teils homogene, teils jedoch auch schollige Umwandlung wie auch eine gesteigerte Eosinophilie des Cytoplasmas gekennzeichnet. Ab und zu sind pyknotische Kerne vorhanden; häufig lassen sich Kerne nicht mehr nachweisen. Im Bereich dieser Parenchymnekrosen finden sich ab und zu schüttere leukocytäre Infiltrate sowie erhaltene und mitunter vermehrte Kupffer'sche Sternzellen.

In den nicht nekrotischen Läppchenanteilen weist das Cytoplasma der Parenchymzellen zahlreiche kleinere und größere Fettvakuolen auf.
b) A.P.: Die Leber ist hochgradig fein- bis mittelgroßtropfig verfettet. Die Läppchenstruktur ist nur in den zentralen Abschnitten gut, in den intermediären und peripheren dagegen schwer zu erkennen, da hier die Verfettung äußerst stark ausgeprägt ist.

In den Parenchymzellen sind die Lipidtröpfchen in weniger verfetteten Zellen feintropfig perivasal und perinukleär abgelagert. In stark verfetteten Läppchenanteilen der Leber weisen die Parenchymzellen eine mittel- bis großtropfige Verfettung auf. Die Lipidtröpfchen im Cytoplasma der Kupffer'schen Sternzellen weisen zum Unterschied zu den Parenchymzellen eine wesentlich mattere Sekundärfluoreszenz in einem schwach-gelblichen Farbton auf.

In der Läppchenperipherie bemerkt man fleckförmig verteilte, dunkelbraune, unregelmäßig begrenzte Bezirke, bei denen es sich um peripher liegende Nekrosen handelt.

c) E.Fl.: In den Kupffer'schen Sternzellen findet man diffus über den gesamten Schnitt verteilt weiß-gelbliches, fluoreszierendes Material.
In den Leberzellen findet man an keiner Stelle fluoreszierendes Material.

d) Sudan: Kein Unterschied zu dem Ergebnis der Astraphosphin-Färbung. Auch hier sind die peripher liegenden Nekrosen deutlich zu erkennen.

e) PAS: In dem gesamten Leberschnitt des Versuchstieres ist kein Glykogen vorhanden; der Schnitt erscheint blaß-rosa. Die Kontrollschnitte zeigen dagegen einen normalen Glykogengehalt.
In den Kupffer'schen Sternzellen des Versuchstieres findet man überall PAS-positives granuläres und tröpfchenartiges Material.
PAS-Diastase: Der gleiche Befund.

f) Z.N.: In den Kupffer'schen Sternzellen und Makrophagen des portalen Bindegewebes hat sich säurefestes Material - oft unregelmäßig stark angefärbt - dargestellt.
Die Nekrosen sind als blasse Bezirke peripher zu erkennen.

2. <u>Milz:</u>

a) H.E.: Vereinzelt treten Follikelnekrosen auf, in denen sich ein Trümmerfeld von Reticulumzellen und Lymphocyten findet.

b) A.P.: Bei Lupenvergrößerung besitzt die Milz nur eine schwache Sekundär-Fluoreszenz, die perifollikulär als ein Doppelsaum - ähnlich wie nach 4 Stunden - verstärkt ist.
Follikel und Follikelrandzone: Die Follikelrandzone besteht hier - wie nach 4 Stunden - aus zwei den Follikel umgebenden Zonen. Bei starker Vergrößerung erkennt man, daß ihre stärkere Fluoreszenz von in beiden Zonen noch deutlich erkennbaren, extrazellulär liegenden Lipidtröpfchen herrührt. Der Follikel selbst ist fettfrei.

Rote Pulpa: Auffallend ist die matte Fluoreszenz der roten Pulpa durch über den ganzen Schnitt verteilte große, gelblich-hellbraun fluoreszierende Reticulumzellen. Ihre schwache Phosphin-Fluoreszenz rührt von kleinen, zum Teil noch gut erkennbaren intracytoplasmatischen Tröpfchen und Partikeln her.

c) E.Fl.: In der roten Pulpa erzeugen im Cytoplasma der Reticulumzellen liegende, granuläre und schollige Elemente eine intensive Eigenfluoreszenz von weißlichgelber Farbe.

d) Sudan: In der perifollikulären Zone und der roten Pulpa stellen sich sudanophile Tröpfchen dar, wobei sie in der Knötchenrandzone oft extrazellulär, in der roten Pulpa dagegen meistens intrazellulär im Cytoplasma der Reticulumzellen liegen.

e) PAS: In den Reticulumzellen der roten Pulpa sind PAS-positive kleinere und größere Granula sichtbar.

f) Z.N.: In den gleichen Zellen der roten Pulpa hat sich rotes, säurefestes Material dargestellt.

3. <u>Lunge:</u>

a) H.E.: Normales Bild.

b) A.P.: In den Lichtungen der Gefäße findet man hell-fluoreszierende kleine Fetttröpfchen. Daneben sieht man zum Teil sehr schwach fluoreszierende Lipidtröpfchen im Cytoplasma der hellbraun gefärbten Alveolarepithelien. Diese

Zellen haben wegen ihrer gleichartigen phosphin-schwachpositiven Fluoreszenz große Ähnlichkeit mit den Reticulumzellen der roten Milzpulpa.
In den peribronchial verlaufenden Lymphgefäßen sind Lipidtröpfchen nicht mehr nachweisbar.

c) E.Fl.: Über den ganzen Schnitt verteilt zeigt sich eine granuläre bis schollige, weißlich-gelbe Eigenfluoreszenz im Cytoplasma einiger Alveolarepithelien und Histiocyten des Interstitiums.

d) Sudan: Zahlreiche, über den Schnitt verteilte Alveolarepithelien und Histiocyten des Interstitiums haben sudanophile Tröpfchen gespeichert.

e) PAS: Histiocyten des interstitiellen Bindegewebes und vereinzelte Alveolarepithelien, die manchmal in das Alveolarlumen abgeschilfert sind, enthalten kleine, PAS-positive Partikel.

f) Z.N.: In den gleichen Zellen stellt sich rosa-rotes, säurefestes Material dar.

4. Niere: } Nur mit Astraphosphin läßt sich in diesen Organen
5. Herz: } eine mäßig starke Lipämie feststellen. Die übrigen
6. Gehirn: } Färbungen ergeben normale Befunde.

Nach 15 Std.:

1. Leber:

a) H.E.: Wiederum treten die schon nach 10 Stunden beschriebenen peripheren und z. T. intermediären Läppchennekrosen auf. Weiterhin findet man in den erhaltenen Parenchymzellen kleine und große Fettvakuolen.

b) A.P.: Es zeigt sich die gleiche massive Leberverfettung wie nach 10 Stunden. Auffallend ist jedoch, daß die Parenchymzellen nicht mehr - wie in den vorausgegangenen Versuchen - feintropfig, sondern jetzt mittel- und großtropfig verfettet sind. Dagegen besteht in den Lichtungen der Gefäße weiterhin eine feintropfige Lipämie. In den

Kupffer'schen Sternzellen lassen sich Fetttröpfchen nicht sicher nachweisen.
In den stark verfetteten peripheren und intermediären Läppchenanteilen lassen sich wieder herdförmige Leberzellnekrosen (s. S. 21) nachweisen, während in den nicht so stark verfetteten zentralen Läppchenzonen keine Nekrosen zu finden sind.

c) E.Fl.: Die schollige und granuläre Eigenfluoreszenz im Cytoplasma der Kupffer'schen Sternzellen und der Histiocyten des portalen Feldes läßt keine Unterschiede zu dem Versuchsstadium nach 10 Stunden erkennen.

d) Sudan: Die Kupffer'schen Sternzellen und Makrophagen des portalen Feldes haben sudanophile Tröpfchen und Partikel gespeichert, die jetzt erstmalig in ihrer Anfärbbarkeit von den Fetttropfen in den Parenchymzellen abweichen: Die Fetttröpfchen in den Parenchymzellen stellen sich normal orange-gelblich dar, während die Fetttröpfchen in den Kupffer'schen Sternzellen und Makrophagen des portalen Gewebes einen orange-bräunlichen Farbton besitzen.

e) PAS: Fast völliger Glykogenverlust der Leberzellen. Die Kupffer'schen Sternzellen und Histiocyten des portalen Feldes sind mit körnchen- und tröpfchenartigem, PAS-positivem Material beladen. Die Parenchymzellen dagegen enthalten keinerlei PAS-positive Granula.
PAS-Diastase: Gegenüber der üblichen PAS-Reaktion besteht kein wesentlicher Unterschied.

f) Z.N.: Kein wesentlicher Unterschied zu dem Befund nach 10 Stunden.

2. <u>Milz:</u>

a) H.E.: Ähnlich wie nach 10 Stunden sind auch nach 15 Stunden vereinzelt Follikelnekrosen (s. S. 22) vorhanden.

b) A.P.: Ein fluoreszierender "Fettdoppelsaum" um die Follikel wie nach 10 Stunden ist nicht mehr vorhanden; sonst zeigen sich die gleichen Befunde.

c) E.Fl.: Die Reticulumzellen der roten Pulpa haben feine Granula und schollige Partikel gespeichert, die Eigenfluoreszenz verschiedener Intensitätsgrade in einem weißgelblichen und gelben Farbton erzeugen.

d) Sudan: Es besteht kein "Fettdoppelsaum" um den Follikel, aber eine perifollikuläre Betonung von sudanophilen Lipidtröpfchen liegt noch vor. Die perifollikulär liegenden extrazellulären Tröpfchen besitzen eine gut erhaltene Sudanophilie. Die von den Makrophagen der roten Pulpa gespeicherten Fetttröpfchen und Fettpartikel zeigen dagegen eine abgeschwächte Sudanophilie von orange-bräunlichem Farbton.

e) PAS: Die Makrophagen der roten Pulpa sind angefüllt mit rosa-roten und stark roten PAS-positiven Granula. Morphologisch entspricht der Befund dem obigen Sudan-Befund; die dort schwach sudanophilen Partikel in den Reticulumzellen der roten Pulpa stellen sich hier PAS-positiv dar.

f) Z.N.: In mehreren Reticulumzellen der roten Pulpa findet man säurefestes Material.

3. Lunge:

a) H.E.: Keine wesentlichen Besonderheiten.

b) A.P.: Die Alveolarepithelien sind stärker verfettet als in früheren Versuchen. Heller fluoreszierende Tröpfchen findet man in den Lichtungen der großen Lungengefäße und der Kapillaren, schwächer fluoreszierende im Cytoplasma der oft zu Gruppen angeordneten Alveolarepithelien. Diese besitzen wegen der schwachen Phosphin-Fluoreszenz der Lipidtröpfchen eine gelblich-braune Farbe.

c) E.Fl.: Über den gesamten Schnitt verstreut findet man in den Phagocyten (Alveolarepithelien und Histiocyten des Interstitiums) der Lunge kleine und größere Granula, die eine Eigenfluoreszenz verschiedener Intensitätsgrade in einem gelblichen Farbton zeigen.

d) Sudan: Die Alveolarepithelien und Histiocyten des interstitiellen Bindegewebes weisen eine starke Verfettung auf. Auffallend ist dabei, daß die intravasal liegenden kleinen und mittelgroßen Lipidtröpfchen eine gut erhaltene Sudanophilie besitzen. Dagegen haben sich die intrazellulär liegenden Fetttröpfchen und Partikel schwächer mit Sudan angefärbt; sie erscheinen in einem orange-bräunlichen und gelbbräunlichen Farbton.

e) PAS: In zahlreichen über den Schnitt verteilten Alveolarepithelien und Histiocyten des interstitiellen Bindegewebes sind rosa-rote und rote PAS-positive Granula enthalten.

f) Z.N.: Einige rosa-rote, säurefeste Granula lassen sich in den gleichen Zellen der Lunge erkennen.

4. Niere:

a) H.E.: Vakuolen lassen sich nicht sicher in den Tubulusepithelien der Hauptstücke feststellen. Sonst keine Besonderheiten.

b) A.P.: Die Tubulusepithelien der Hauptstücke sind in weiten Bezirken an ihrer Basis feintropfig verfettet. In den Lichtungen der Gefäße läßt sich wie in den vorausgegangenen Versuchen feintropfiges Fett nachweisen. In den Tubuluslichtungen sind keine Fetttröpfchen vorhanden.

c) Sudan: Keine Abweichungen zu den fluoreszenzmikroskopischen Befunden.

d) PAS: Normales Bild.

5. Herz: } Mit Astraphosphin läßt sich in beiden Organen eine
5. Gehirn: } Lipämie nachweisen. Alle übrigen Färbungen ergeben keine pathologischen Befunde.

Nach 24 Std.:

1. Leber:

a) H.E.: Ausgedehnte periphere Nekrosen, welche schon nach 10 und 15 Stunden beschrieben worden sind. Im Cytoplasma der erhaltenen Parenchymzellen kleine und große Fettvakuolen.

b) A.P.: Die Parenchymzellen zeigen eine massive großtropfige Verfettung. Nur die Zellen des Läppchenzentrums sind geringer und fein- bis mittelgroßtropfig verfettet. Dagegen findet man in den Lichtungen der Gefäße und Sinusoide eine mäßig starke, aber feintropfige Lipämie. In den

Kupffer'schen Sternzellen lassen sich phosphinpositive Lipidtröpfchen nicht mehr nachweisen. In der Läppchenperipherie trifft man wiederholt auf die schon beschriebenen Nekrosen.

c) E.Fl.: In den Kupffer'schen Sternzellen und einigen Histiocyten des portalen Gewebes finden sich feine und gröbere Granula mit einer weiß-gelblichen intensiven Eigenfluoreszenz.

d) Sudan: Die Parenchymzellen sind besonders in ihren peripheren und zum Teil auch intermediären Läppchenanteilen großtropfig verfettet.
Die Kupffer'schen Sternzellen und Histiocyten des perivasalen Bindegewebes enthalten teilweise schwächer sudanophile Tröpfchen und Partikel von rot-brauner und gelbbrauner Farbe.

e) PAS: Vollständiger Glykogenverlust der Leberzellen. Die PAS-positiven Granula in den reticulo-endothelialen Zellen der Leber treten jetzt deutlicher hervor. Die Granula sind zum Teil leuchtend rot, oft gröber granuliert als früher und mitunter paketartig angeordnet.
PAS-Diastase: Keine Änderung der Befunde.

f) Z.N.: Rosa-rotes, säurefestes Material ist in einigen Kupffer'schen Sternzellen und Histiocyten des portalen Feldes nachweisbar. Auffallend ist, daß sich die Partikel verschieden stark anfärben und daß sich bei tröpfchenartigen Gebilden häufig nur der Randsaum rosa-rot darstellt.

2. Milz:

a) H.E.: Normales Gewebsbild. Pigmentgranula sind zu diesem Zeitpunkt noch nicht sicher nachweisbar.

b) A.P.: Die Reticulumzellen der roten Pulpa zeigen eine sehr schwache, gelb-bräunliche Sekundär-Fluoreszenz. Diese äußerst matte Sekundär-Fluoreszenz geht von kleinen, intracytoplasmatischen Fetttröpfchen aus.

In der Follikelrandzone lassen sich keine extrazellulär liegenden Lipidtröpfchen mehr nachweisen.

c) E.Fl.: Die Reticulumzellen der roten Pulpa besitzen eine starke granuläre bis schollige Eigenfluoreszenz. Die Granula treten deutlicher hervor, sie fluoreszieren klarer und haben einen bräunlicheren Farbton als nach 4, 10 und 15 Stunden.

d) Sudan: Keine sudanophilen Lipidtröpfchen in der perifollikulären Zone. Die Reticulumzellen der roten Pulpa haben ein grob- und feingranuläres sudanophiles Material gespeichert, wobei die groben Granula sich braungelb, die feinen Granula jedoch nur sehr schwach gelb anfärben.

e) PAS: Die in der roten Pulpa in den Reticulumzellen abgelagerten Granula sind deutlich PAS-positiv.

f) Z.N.: Die kleineren und größeren Partikel in den Reticulumzellen der roten Pulpa haben sich teils rot, teils nur schwach rosa angefärbt.

3. Lunge:

a) H.E.: Normales histologisches Bild.

b) A.P.: Keine Abweichungen zu den Ergebnissen des früheren Versuchsstadiums.

c) E.Fl.: In den Alveolar-Phagocyten und Histiocyten des Interstitiums findet man intensiv gelblich fluoreszierende Granula.

d) Sudan: In den Alveolarepithelien haben sich nur vereinzelt sudanophile Lipidtröpfchen dargestellt. Sonst kein Unterschied zu den Versuchsergebnissen nach 15 Stunden.

e) PAS: Die Alveolarepithelien und Histiocyten des Interstitiums haben stark PAS-positive granuläre Elemente gespeichert.
In den Kontrollschnitten sind keinerlei PAS-positive Granula zu sehen.

f) Z.N.: Mit dieser Methode stellen sich die phagocytierten Granula zum Teil als säurefest heraus. Die Lunge der Kontrolltiere enthält nirgends säurefestes Material.

4. Niere:

a) H.E.: Die Tubulusepithelien der Hauptstücke sind mit kleinen und größeren Vakuolen durchsetzt.

b) A.P.: Die Epithelien der Hauptstücktubuli sind hochgradig fein- und mittelgroßtropfig verfettet. Die Epithelien der Sammelrohre dagegen sind fettfrei.

In den Lichtungen der Gefäße besteht eine mäßig starke, feintropfige Lipämie. Dagegen lassen sich in den Lichtungen der Tubuli keine Fetttröpfchen nachweisen.

c) Sudan: Keine Abweichungen zu den fluoreszenzmikroskopischen Befunden.

d) PAS: Kein PAS-positives Material nachweisbar.

5. Herz: } Mit Astraphosphin und Sudan läßt sich in diesen
6. Gehirn: } Organen eine feintropfige Lipämie nachweisen. Die übrigen Reaktionen und Färbungen ergeben normale Befunde.

Nach 48 Std.:

1. Leber:

a) H.E.: Ausgedehnte, periphere und intermediäre Einzelzell- und Gruppennekrosen des Leberläppchens, wie sie schon nach 10 Stunden beschrieben worden sind (s. S. 21). In den Leberparenchymzellen stellen sich große Vakuolen dar. In den Kupffer'schen Sternzellen und Histiocyten des portalen Gewebes sind schwach gelb-bräunliche Granula zu erkennen.

b) A.P.: Ähnlich wie nach 24 Stunden findet man in den Leberzellen eine massive großtropfige Verfettung, während sich in den Lichtungen der Gefäße zahlreiche feintropfige Lipidablagerungen darstellen. In der Peripherie des Läppchens und zum Teil auch in der intermediären Zone trifft man auf die schon oben beschriebenen Einzelzell- und Gruppennekrosen.

c) E.Fl.: Eine klare, weiß-gelbliche Eigenfluoreszenz geht von kleineren und größeren Partikeln aus, die in den Kupffer'schen Sternzellen und Histiocyten des Gefäßbindegewebes gespeichert sind.

d) Sudan: Keine Abweichungen zu dem obigen Astraphosphin- und dem Sudan-Befund nach 24 Stunden.

e) PAS: Es stellt sich der gleiche Befund wie nach 24 Stunden dar. Wiederum sind die PAS-positiven Partikel oft paketartig in den Kupffer'schen Sternzellen und Histiocyten angeordnet.
PAS-Diastase: Kein Unterschied zur üblichen PAS-Reaktion.

f) Z.N.: Über den Schnitt verteilt trifft man in den Kupffer'schen Sternzellen und Histiocyten des portalen Feldes auf säurefestes, rosa und stark rot angefärbtes Material. Auch hier fällt auf, daß die Anfärbbarkeit verschiedener Partikel nicht nur in verschiedenen Zellen, sondern auch in ein und derselben Zelle unterschiedlich stark ausfällt. Sogar innerhalb eines größeren Partikels oder Tropfens ist eine verschieden starke Anfärbbarkeit festzustellen.

2. Milz:

a) H.E.: In zahlreichen Reticulumzellen der roten Pulpa f indet man schwach gelb-bräunliche Granula. Sonst normales Bild.

b) A.P.: In der Milz sind mit Astraphosphin Lipidtröpfchen nicht mehr sicher nachweisbar.

c) E.Fl.: Grob- und kleingranuläres, intensiv gelb-braun fluoreszierendes Material ist in zahlreichen Reticulumzellen der roten Pulpa enthalten.

d) Sudan: Sudanophile Tröpfchen sind nicht mehr sicher nachweisbar.
In den Reticulumzellen der roten Pulpa erkennt man größere und kleinere Partikel von wechselnder Sudanophilie. Einige stellen sich rot oder gelb-braun, andere wiederum goldbraun oder nur braun dar.

e) PAS: Die beschriebenen Partikel in den Reticulumzellen färben sich mit der PAS-Reaktion rosa-rot an.

f) Z.N.: Zart-rosa und rotes säurefestes Material ist in den Reticulumzellen der roten Pulpa aufzufinden. Es stellen sich weitaus weniger säurefeste als PAS-positive Granula dar.

3. Lunge:
Bei sämtlichen Färbungen unterscheidet sich der Lungenbefund nicht von den Versuchsergebnissen nach 24 Stunden.

4. Niere:
a) H.E.: Kleine und größere Vakuolen stellen sich in den Hauptstückepithelien dar.
b) A.P.: Die Tubulusepithelien der Hauptstücke sind in großem Ausmaß an ihrer Basis mittelgroßtropfig und lumenwärts feintropfig verfettet. Auch im Tubuluslumen findet man zahlreiche feine Lipidtröpfchen.

In den Lichtungen der Nierengefäße besteht gleichzeitig eine mäßig starke Lipämie.
c) Sudan: Keine Abweichungen zu den fluoreszenzmikroskopischen Befunden.
d) PAS: Kein PAS-positives Lipidmaterial anfärbbar.

5. Herz:) Bei der H.E.-Färbung zeigen beide Organe ein norma-
6. Gehirn:) les Bild. Mit Astraphosphin lassen sich intravasal nicht mehr sicher Lipidtröpfchen nachweisen. Mit Sudan haben sich keine Fetttröpfchen dargestellt.

Nach 7 Tagen:

1. Leber:
a) H.E.: Schon bei schwacher Vergrößerung bemerkt man in den Kupffer'schen Sternzellen und Histiocyten des Gefäßbindegewebes zahlreiche schwach gelb-bräunliche Granula. Die früher beschriebenen Einzelzell- und Gruppennekrosen sind nicht mehr vorhanden; dafür findet man an den betreffenden Stellen ein aus Fibrocyten bestehendes junges Bindegewebe.
b) A.P.: Versuchs- und Kontrolltiere besitzen den gleichen Fettgehalt in der Leber.
c) E.Fl.: In dem gesamten Schnitt stellt sich eine schollige und granuläre, gelbliche und gelb-bräunliche Eigenfluoreszenz dar. Sie tritt verstärkt in den Läppchenbezirken auf,

die zum Teil unmittelbar an die portalen Felder und Zentralvenen angrenzen. Das fluoreszierende Material ist dabei nicht in den Parenchymzellen, sondern nur in den Kupffer'schen Sternzellen und Histiocyten des Gefäßbindegewebes aufzufinden.

d) Sudan: Bei Versuchs- und Kontrolltieren ist kein Fett nachweisbar. Wiederum treten gold-braune, unterschiedlich große Partikel in Zellen und Zellgruppen der Sinusoide (Kupffer'sche Sternzellen) und des periportalen Bindegewebes auf.

e) PAS: In den Leberzellen stellt sich wieder Glykogen dar. Der Glykogengehalt ist aber noch geringer als bei den Kontrolltieren.

Die großen und kleinen Partikel in den KUpffer'schen Sternzellen und den Histiocyten des portalen Bindegewebes haben sich intensiv PAS-positiv angefärbt.
PAS-Diastase: Kein wesentlicher Unterschied zur üblichen PAS-Reaktion.

f) Z.N.: Die PAS-positiven Partikel stellen sich nach wie vor säurefest dar. Sie erscheinen in einem rosa bis tief-roten Farbton, der in den einzelnen Zellen verschieden stark ausfällt.

2. Milz:

a) H.E.: In den Reticulumzellen der roten Pulpa findet man zahlreiche kleinere und größere, schwach hell-gelbliche, gelbbraune und braune Granula. Sonst normales Bild.

b) A.P.: Mit Astraphosphin sind Fetttröpfchen nicht nachweisbar.

c) E.Fl.: Die Reticulumzellen der roten Pulpa sind mit fein- und grobgranulären, teils gelblichen, teils mehr rötlichbraunen, fluoreszierenden Partikeln beladen.
Scharf abgesetzt treten die Milzfollikel hervor, in denen ebenso wie in den Kontrollschnitten einige wenige fluoreszierende Partikel vorhanden sind, wie sie schon nach 5 Minuten beschrieben worden sind.

d) Sudan: Kein Fett nachweisbar.
Die Reticulumzellen der roten Pulpa haben in weiten Strecken gold-braune und braune Granula gespeichert.
e) PAS: Die in zahlreichen Reticulumzellen der roten Pulpa abgelagerten Granula stellen sich stark PAS-positiv dar.
f) Z.N.: Zahlreiche der in den Reticulumzellen der roten Pulpa aufgenommenen Granula erweisen sich als säurefest.

3. Lunge:
a) H.E.: Schwach gelbliche und bräunliche Granula sind in Histiocyten des interstitiellen Bindegewebes und in Alveolarepithelien enthalten.
b) A.P.: Keine Lipidtröpfchen auffindbar.
c) E.Fl.: Vereinzelt sieht man in den Alveolarepithelien und einigen Histiocyten des Interstitiums gelblich eigenfluoreszierende Partikel.
d) Sudan: Keine Fetttröpfchen darstellbar. In einigen Alveolarepithelien und Histiocyten des Interstitiums befinden sich gold-braune Granula.
e) PAS: Dunkelrotes, grob- und feingranuläres PAS-positives Material ist in den oben beschriebenen Zellen nachweisbar.
f) Z.N.: In den gleichen Zellen stellen sich die Partikel säurefest dar; sie haben sich aber unterschiedlich stark - teils rosa, teils rot - angefärbt.

4. Niere:) Bei diesen Färbungen zeigen diese Organe ein norma-
5. Herz:) les Bild.
6. Gehirn:)

Nach 4 Wochen:

1. Leber:
a) H.E.: In den Kupffer'schen Sternzellen und Histiocyten der portalen Felder treten zahlreiche schwach gelbliche und bräunliche Granula auf.

b) A.P.: Keine Fetttröpfchen mehr nachweisbar.

c) E.Fl.: Diffus über den Schnitt verteilt liegen in den Kupffer'schen Sternzellen und Histiocyten des Gefäßbindegewebes intensiv gelblich und gelb-bräunlich fluoreszierende Granula. Wiederum treten sie massiert und zu Gruppen vereinigt in Umgebung des portalen Feldes und der Zentralvenen auf. Die Parenchymzellen enthalten keine derartigen Granula.

d) Sudan: Die gleichen Partikel erscheinen bei der Sudanfärbung in gelb-brauner und gold-brauner Farbe. Sudanophile Fetttröpfchen sind nicht nachweisbar.

e) PAS: Die Partikel färben sich mit dieser Methode dunkelrot an.
PAS-Diastase: Keine Abweichungen zur üblichen PAS-Reaktion.

f) Z.N.: Die Anzahl der säurefesten, rot angefärbten Granula in den Kupffer'schen Sternzellen und den Histiocyten des portalen Feldes hat sich - im Vergleich zu dem Versuchsergebnis nach 7 Tagen - deutlich vermindert.

2. Milz:

a) H.E.: Die Reticulumzellen der roten Pulpa haben zahlreiche schwach gelbliche, gelbliche und bräunliche Granula gespeichert. Auffallend ist, daß sie in den Reticulumzellen der Milz deutlich feiner granuliert sind als in den Kupffer'schen Sternzellen der Leber, wo sie einen mehr scholligen Charakter besitzen.

b) A.P.: Fett läßt sich nicht nachweisen.

c) E.Fl.: Die Reticulumzellen der roten Pulpa sind mit fluoreszierendem granulären Material beladen, welches teils eine sehr intensive, teils eine etwas schwächere Eigenfluoreszenz von gold-gelber und brauner Farbe zeigt.

d) Sudan: Diese Granula sind nicht mehr mit Sudan anfärbbar. Sie stellen sich ähnlich der Eigenfluoreszenz in einem gold-braunen und braunen Farbton dar.

e) PAS: Bei dieser Färbung erscheinen die Granula stark PAS-positiv.

f) Z.N.: Bei Prüfung ihrer Säurefestigkeit färben sich die Granula intensiv rot an.

3. Lunge: } Diese Organe weichen bei den angewandten Färbungen
4. Niere: } nicht von den vorangegangenen Versuchsergebnissen ab.
5. Herz: }
6. Gehirn: }

Nach 6 Wochen:

1. Leber:
   a) H.E.: Vereinzelt lassen sich in den Kupffer'schen Sternzellen und Histiocyten des portalen Gewebes schwach gelbliche und bräunliche, grobgranulierte Partikel auffinden. Sonst zeigt sich ein normales Bild.
   b) A.P.: Kein Unterschied im Fettgehalt bei Versuchs- und Kontrolltier.
   c) E.Fl.: In der Umgebung der periportalen Felder treten im Cytoplasma zahlreicher Kupffer'scher Sternzellen sowie in den Histiocyten des portalen Bindegewebes gold-braune, intensiv fluoreszierende Granula auf, die oft zu größeren und kleineren Paketen vereinigt sind.
   In diesem Versuch haben sich in der Leber bedeutend weniger eigenfluoreszierende Granula dargestellt als nach 7 Tagen und 4 Wochen. In den Parenchymzellen sind diese Granula nicht vorhanden.
   d) Sudan: Mit Sudan kein Fett darstellbar. Vereinzelt trifft man auf gold-braune, im Cytoplasma der Kupffer'schen Sternzellen und Histiocyten des portalen Gewebes liegende Granula.
   e) PAS: Auch bei dieser Färbung läßt sich eine Verminderung von PAS-positiven Partikeln in den Kupffer'schen Sternzellen und Histiocyten der portalen Felder feststellen. Die PAS-positiven Partikel kommen in fein- und besonders grobgranulärer und scholliger Form vor.
   PAS-Diastase: Kein Unterschied zur üblichen PAS-Färbung.
   f) Z.N.: Ebenso wie mit den vorangegangenen Methoden ist bei dieser Färbung ein deutlicher Verlust der roten, säurefesten Granula in den oben beschriebenen Zellen zu verzeichnen.

2. Milz:

a) H.E.: Die Reticulumzellen der roten Pulpa sind mit gelbbräunlichen Granula übersät. Sonst normales Bild.

b) A.P.: Mit Astraphosphin kein Fett anfärbbar.

c) E.Fl.: Die Reticulumzellen der roten Pulpa besitzen eine intensive fein- und grobgranuläre, goldbraune Eigenfluoreszenz.

d) Sudan: Kein Fett anfärbbar. Zahlreiche Reticulumzellen der roten Pulpa sind mit gold-braunen und braunen Granula überladen. Sie zeigen keine Sudanophilie.

e) PAS: Die zahlreichen in den Reticulumzellen der roten Pulpa gespeicherten Granula stellen sich intensiv PAS-positiv dar.
Diese Granula sind meistens feiner granuliert als in den entsprechenden Zellen der Leber, wo sie mehr schollenartiges Aussehen haben.

f) Z.N.: Die gleichen Granula färben sich bei Prüfung der Säurefestigkeit stark rot an.

3. Lunge:

a) H.E. In vereinzelten Alveolarepithelien und Histiocyten des Interstitiums sind kleine, schwach bräunliche Partikel gespeichert.

b) A.P.: Kein Fett darstellbar.

c) E.Fl.: Die Partikel in den oben beschriebenen Zellen besitzen eine Eigenfluoreszenz von gelblicher und gelbbräunlicher Farbe.

d) Sudan: Keine Fetttröpfchen nachweisbar. Vereinzelt lassen sich nicht sudanophile, braun gefärbte Granula im Cytoplasma einiger Alveolarepithelien und Histiocyten des interstitiellen Bindegewebes nachweisen.

e) PAS: Die gleichen Partikel sind intensiv PAS-positiv.

f) Z.N.: Nach Ziehl-Neelsen färben sich diese Partikel rot an.

4. Niere: } Diese Organe zeigen bei den verwendeten Färbungen
5. Herz: } ein normales histologisches Bild.
6. Gehirn: }

Tabelle 4: Änderung der fluoreszenzmikroskopischen und histochemischen Eigenschaften der Lipidtröpfchen bei der Umwandlung zu Lipopigmenten.

M i l z , Reticulumzellen der roten Pulpa

Zeit	Astraphosphin-Fluoreszenz	Sudanophilie	Eigenfarbe	Eigenfluoreszenz	PAS	Ziehl-Neelsen
5'	++++	++++		0		
10'	++++	++++		0		
30'	+++	++++		0		
60'	++	++++		0	+	
2 h	++	++++		0	+	
4 h	++	++++		+	++	(+)
10 h	+	+++		++	++	+
15 h	+	++		++	++	+
24 h	0	++		++	++	+
48 h	0	++	schwach gelblich	+++	++	++
7 Tg.	0	+	schwach gelbbräunlich	+++	+++	+++
4 Wo.	0	+	gelb-bräunlich	+++	+++	+++
6 Wo.	0	0	bräunlich und braun	++++	++++	+++

Reaktion: ++++ = sehr stark; +++ = stark; ++ = deutlich; + = schwach; 0 = negativ.

D. Diskussion:

I. Wo werden Lipopigmente durch die intravenöse Injektion einer Lebertranemulsion erzeugt?

Nach der Injektion der Lebertranemulsion kommt es zunächst zu einer Lipämie und zu einer Ablagerung von Fetttröpfchen in den Zellen verschiedener Organe. Diese intracytoplasmatischen Fetttröpfchen werden dann allmählich in fetthaltige Granula und schließlich in Pigmente umgewandelt. Der Zeitpunkt, zu dem erstmals Pigmente nachweisbar sind, hängt unter unseren Versuchsbedingungen von den jeweils angewandten licht- und fluoreszenzmikroskopischen Methoden ab.

In unseren Experimenten fanden wir nach intravenöser Injektion von Lebertran Lipopigmente vornehmlich in der Leber, der Milz und der Lunge. Hier traten die Pigmentgranula in ganz bestimmten Zelltypen auf. In der Leber waren es die Kupffer'schen Sternzellen der Sinusoide und die Histiocyten der portalen Felder, in der Milz die Reticulumzellen der roten Pulpa und in der Lunge die Alveolarphagocyten und die Histiocyten des interstitiellen Bindegewebes. Diese Zellen rechnet man allgemein zum Reticulo-Histiocytären System (RHS).

Im gleichen Zellsystem konnten auch HASS 1939 (2), MANN, GEYER, STARE und Mitarbeiter 1948, MAYER, FANCHER, SCHURR und WEBSTER 1957, THOMPSON und Mitarbeiter 1958, 1960 (1) und 1960 (2), SCHUBERT und KRÜGER 1962, NEGLIA, BURROWS, THOMPSON II und SCHAFFNER 1963 nach intravenöser Fettapplikation Lipopigmente nachweisen. HASS benutzte dabei Lebertran, den er direkt in die Milz injizierte, die anderen Autoren wandten eine 15%ige Baumwollsaatöl-Emulsion mit dem Handelsnamen Lipomul an. Darüber hinaus kamen auch Olivenöl- und Kokosnußöl-Emulsionen zur Anwendung, welche die gleichen Resultate brachten.

II. Welche Bedeutung kommt dem Lebertran in unseren Versuchen zu?

Aus der Literatur ist es bekannt, daß unlösliche Fettsubstanzen bzw. Fettpigmente durch die verschiedensten Applikationsformen von Lebertran hervorgerufen werden können. So haben durch subcutane Injektion von Lebertran und verschiedenen Lebertranfraktionen HASS 1938 (1), 1938 (2), 1939 (1) und 1939 (2), ENDICOTT 1944, GEDIGK und PIOCH 1965 Lipopigmente in der Subcutis erzeugt. Durch die Lebertranverabfolgung auf trachealem Wege ist PINKERTON 1928 sowie GRAEF, KAUFMANN und KAPLAN 1938 der Nachweis von unlöslichen, säurefesten Fettsubstanzen in der Lunge gelungen. Außerdem konnte HASS 1939 (2) nach direkter Injektion von Lebertran in die Rattenmilz unlösliche, säurefeste Fettsubstanzen in Milz, Leber und Lunge nachweisen. Darüber hinaus beschrieben HASS 1938 (2) und 1939 (2), GRAEF 1939, ENDICOTT 1944, CASSELMAN 1951, HARTROFT 1951, TAPPEL 1955, PORTA 1963 sowie GEDIGK und PIOCH 1965 bei Experimenten in vitro die Erzeugung unlöslicher Fettsubstanzen bzw. Lipopigmente mit Hilfe von Lebertran.

Voraussetzung für eine Lipopigmentbildung sind ungesättigte Fettsäuren, die oxydiert und polymerisiert werden können. Daher wiesen die oben angeführten Autoren auf die im Lebertran reichlich vorhandenen hochungesättigten Fettsäuren hin. So konnten sie z. B. keine Lipopigmentbildung hervorrufen, wenn sie mit Wasserstoff oder Brom abgesättigte Fettsäurefraktionen von Lebertran injizierten (HASS 1938 (1), 1938 (2)) oder nur eine verzögerte Pigmentbildung, wenn sie dem Lebertran als Antioxydans Tokopherol zusetzten (GEDIGK und PIOCH 1965). Andererseits nahm die Pigmentmenge mit der Zahl der Doppelbindungen, die man mit der Jodzahl erfassen kann, laufend zu. Fette mit hoher Jodzahl ergaben viel, Fette mit niedriger Jodzahl wenig Pigment (HASS 1938 (1) und 1938 (2)).

Betrachtet man die chemische Fettsäureanalyse des Lebertrans, so findet man in der Literatur ziemlich übereinstimmende Daten (FLASCHENTRÄGER 1951, S. 362 - 365, PORTA 1963, DEBUCH und CLARA 1965, S. 10 und 173 - 174).

Dorschlebertran besteht danach aus 15 % gesättigten und 85 % ungesättigten Fettsäuren. Bei dem hohen Prozentsatz der ungesättigten Fettsäuren dominieren wiederum die hochungesättigten C_{18}-, C_{20}- und C_{22}-Fettsäuren. In bezug auf den Grad der Äthylenbindungen übertrifft somit der Lebertran fast alle anderen natürlich vorkommenden Fettgemische. Daher ist auch zu verstehen, warum wir in unseren Experimenten einen so massiven Pigmentbefall des Reticulo-Histiocytären Systems nach intravenöser Injektion von Lebertran beobachten konnten.

III. In welcher Weise ändern die Pigmentkörnchen im Laufe ihrer Entstehung und Alterung ihre fluoreszenzmikroskopischen und histochemischen Eigenschaften?

Daß Lipopigmente einem Umwandlungsprozeß unterliegen, wurde schon von HASS 1938 (1), ENDICOTT 1944, MASON, DAM und GRANADOS 1946, PORTA 1963, NEGLIA, BURROWS, THOMPSON II und SCHAFFNER 1963 beobachtet. Die Arbeiten von GEDIGK, FISCHER 1958 und 1959, GEDIGK 1958, sowie GEDIGK und PIOCH 1965 legten dann dar, in welcher Weise dieser Umbau erfolgt, und daß die Änderungen der morphologischen, histochemischen und färberischen Eigenschaften der Lipopigmente durch ihren Alterungsprozeß bedingt sind.

Die Entstehung der Lipopigmente und ihren Alterungsprozeß, in dessen Verlauf sich ihre fluoreszenzmikroskopischen, färberischen und histochemischen Eigenschaften verändern, konnten auch wir an den durch intravenöse Lebertraninjektion erzeugten Pigmentgranula nachweisen.

Dieser Prozeß läßt sich nach unseren Versuchsergebnissen am besten an der Milz darlegen. Um diesen Vorgang besser deuten zu können, möchten wir zunächst die Verfettungsform der Milz näher beschreiben:

Nach intravenöser Gabe der Lebertranemulsion fanden wir nach 5 und 10 Minuten eine starke Fettansammlung in der Follikelrandzone, während der Follikel selbst praktisch fettfrei und die rote Pulpa nur äußerst leicht fleckförmig verfettet war. Die Fetttröpfchen lagen zu diesen Zeitabschnitten in der Follikelrandzone extrazellulär. Nach 30 Minuten beginnt von der Follikelrandzone aus eine Fettinfiltration der roten Pulpa, die ungefähr nach 1 Stunde abgeschlossen ist. Die Lipidtröpfchen liegen zu diesem Zeitpunkt in der roten Pulpa häufig schon im Cytoplasma der Reticulumzellen, während in der perifollikulären Zone hauptsächlich noch extrazellulär liegende Fetttröpfchen anzutreffen sind. Dieses Bild der Fettverteilung ändert sich nicht wesentlich nach 2, 4, 10 und 15 Stunden. Zu diesen Zeitabschnitten ist die rote Pulpa diffus verfettet. Die Fetttröpfchen liegen hier zahlreich im Cytoplasma der Reticulumzellen, während in der betont verfetteten Follikelrandzone noch häufig extrazellulär liegende Fetttröpfchen zu sehen sind. Ab 24 Stunden sind in der Milz Fetttröpfchen nicht mehr sicher nachweisbar; jedoch treten jetzt an Stelle der in den Reticulumzellen der roten Pulpa gespeicherten Fetttröpfchen körnchen- und schollenartige Lipopigmente auf.

Bei unseren Versuchsergebnissen fiel immer wieder auf, daß die größeren, extrazellulär liegenden Fetttröpfchen in der Follikelrandzone vorkamen, während die kleineren in der roten Pulpa anzutreffen waren und hier in den Reticulumzellen gespeichert wurden (siehe Tabelle 3, S. 17).

Die bevorzugte Ablagerung von Fetttröpfchen nach kurzen Zeitintervallen (5 - 10 Minuten) in der perifollikulären Zone ist schon länger bekannt und experimentell mehrfach bestätigt worden, ohne daß es hierfür überzeugende Erklärungen geben würde.

"Herrlinger (zitiert bei KAUFMANN 1955, S. 772) unterteilt die rote Pulpa nach kreislaufdynamischen Gesichtspunkten (Injektionsversuche) in eine subkapsuläre, perifollikuläre und interfollikuläre Zone... Die Besonderheit dieser Zone geht auch daraus hervor, daß man nicht selten z. B. im Bereich der perifollikulären Zone eine bevorzugte Ablagerung von Fremdkörpern (Kohle, Thorotrast) nachweisen kann."

Ähnliche Ergebnisse beschrieben auch MURRAY und FREEMAN 1951, die fettigen Chylus und eine Olivenöl-Emulsion Ratten intravenös injiziert hatten. Dabei zeigte sich, daß nur nach Olivenöl- nicht aber nach Chylusinjektion eine starke Verfettung der Follikelrandzone nach 10 Minuten anzutreffen war. Auch bei ihnen begann eine Fettausbreitung in die rote Pulpa nach 30 Minuten, während die Milzfollikel stets fettfrei blieben.

Zu den gleichen Versuchsergebnissen kamen auch SCHUBERT und KRÜGER 1962 und ELSTER 1963. SCHUBERT und KRÜGER injizierten Ratten intravenös zwei Fettemulsionen von verschiedener Tröpfchengröße. Nach Injektion der feintropfigen

Emulsion stellten sie nur eine geringe Fettanreicherung in der Follikelrandzone fest, während nach Injektion der etwas großtropfigeren Emulsion (Tröpfchen-Durchmesser 1,5 - 2,5 µ) die Follikelrandzone massiv verfettet war.

MURRAY und FREEMAN 1951 sowie SCHUBERT und KRÜGER 1962 räumen der Gefäßversorgung der Follikelrandzone aufgrund ihrer Versuchsergebnisse eine Sonderstellung ein. Sie denken dabei an eine vom Follikel getrennte Blutversorgung der Follikelrandzone.

Neuere elektronenmikroskopische Untersuchungen von MOORE, MUMAW und SCHOENBERG 1964 und WEISS 1964 haben zur Orthologie und Pathologie der Follikelrandzone beigetragen. Sie ist danach ein klar vom Milzfollikel getrenntes Gebiet, welches einen geräumigen, unregelmäßig begrenzten, vasculären Raum darstellt, der zahlreiche freie Zellen, wie große Lymphocyten, Plasmazellen und Makrophagen enthält. Dieser Raum steht einerseits in direkter Verbindung mit der roten Pulpa, andererseits in direkter Verbindung mit dem Gefäß-System des Follikels. So kommuniziert diese Zone auf der einen Seite mit den parafollikulären Sinusoiden der roten Pulpa (MOORE, MUMAW, SCHOENBERG 1964), auf der anderen Seite münden zahlreiche Gefäßäste der Follikelarterien in die Follikelrandzone ein (WEISS 1964).

Mit diesen Versuchsergebnissen lassen sich vielleicht auch unsere Befunde an der Milz, speziell der Follikelrandzone, erklären. Die körperfremden Fetttröpfchen gelangen mit Hilfe des Blutstromes direkt in die Follikelrandzone. Hier häufen sich die größeren Fetttröpfchen aufgrund der besonderen Struktur dieser Zone zunächst extrazellulär an, während die feineren Tröpfchen durch direkte Verbindungen in die rote Pulpa gelangen, dort von den Reticulumzellen phagocytiert und in Pigmente umgebaut werden. Ob auch eine Verkleinerung der zunächst in der Follikelrandzone extrazellulär liegenden größeren Fetttröpfchen möglich ist, die dann in die rote Pulpa abwandern und dort gespeichert werden, läßt sich mit unserer Versuchsanordnung vorerst nicht klären.

1. Fluoreszenzmikroskopische Veränderungen:

a) Sekundärfluoreszenz:

Die strahlend hellgelbe bis gelb-grünliche Sekundärfluoreszenz der Fetttröpfchen nach Astraphosphin-Fluorochromierung schlägt allmählich nach 30 und 60 Minuten in den Reticulumzellen der roten Pulpa in eine mattere und gelbliche bis gelb-bräunliche Sekundärfluoreszenz um. In der Follikelrandzone dagegen behalten die hauptsächlich extrazellulär liegenden Fetttröpfchen ihre intensive hellgelbliche Sekundärfluoreszenz (siehe Tabelle 3, S. 17). Nach 4, 10 und 15 Stunden sind hauptsächlich in der roten Pulpa schwach gelb-bräunlich fluoreszierende Reticulumzellen zu erkennen, deren schwache Phosphin-Fluoreszenz von kleinen gespeicherten Fetttröpfchen herrührt. Nach 24 Stunden ist in der Milz mit Astraphosphin Fett nicht mehr sicher nachweisbar.

b) Eigenfluoreszenz:

Dieser im Laufe der ersten 24 Stunden abnehmenden Astraphosphin-Fluoreszenz (Sekundärfluoreszenz) entspricht eine gegenläufige Bewegung der Eigenfluoreszenz. Bis zu 2 Stunden ist außer in den Milzfollikeln von Versuchs- und Kontrolltier (hierbei handelt es sich offenbar um normalerweise im Milzfollikel der Ratte vorkommende feingranuläre Lipopigmente) keine Eigenfluoreszenz nachzuweisen. Erstmalig nach 4 Stunden ist in den Reticulumzellen der roten Pulpa vereinzelt eine gelbliche, grob- und feingranuläre Eigenfluoreszenz vorhanden. Deutlicher wird dieser Befund nach 10 und 15 Stunden. Nun erkennt man einwandfrei in den Reticulumzellen der roten Pulpa gelblich eigenfluoreszierende, größere und kleinere Granula und tröpfchenartige Gebilde. Dieses eigenfluoreszierende Material entspricht in Lage und Ausdehnung genau den gelb-bräunlichen phosphin-schwach-positiven Reticulumzellen der Astraphosphin-Fluorochromierung nach 10 und 15 Stunden. Nach 24 und 48 Stunden, 7 Tagen. 4 und 6 Wochen

ändern sich weiter Farbe und Intensität der eigenfluoreszierenden Granula in der roten Pulpa. Dabei geht der Farbton von gelblich über gelb-bräunlich und gold-braun in braun über, wobei die Fluoreszenzintensität der braunen Granula schwächer wird.

Für Lipopigmente ist eine Eigenfluoreszenz charakteristisch, die sich im Laufe der Pigmentalterung verändert (GEDIGK und FISCHER 1958 und 1959, GEDIGK und PIOCH 1965, POPPER, GYÖRGY und GOLDBLATT 1944, PORTA 1963 und NEGLIA, BURROWS, THOMPSON II und SCHAFFNER 1963).

Neutralfette dagegen erzeugen nach Fluorochromierung mit Astraphosphin eine intensive hellgelbe bis gelb-grünliche Sekundärfluoreszenz. POPPER, GYÖRGY und GOLDBLATT 1944 konnten außerdem in Übereinstimmung mit unseren Befunden einen Übergang der Astraphosphin-Fluoreszenz (Sekundärfluoreszenz) der Fetttröpfchen zur Eigenfluoreszenz des Ceroids zeigen. So läßt sich dieses gegenläufige fluoreszenzmikroskopische Verhalten der Fettpartikel, welches wir besonders gut in den Reticulumzellen der roten Milzpulpa beobachten konnten, ohne weiteres mit einem Umbau des Fettbausteines der in den Reticulumzellen der roten Pulpa gespeicherten Fetttröpfchen zu Lipopigmenten erklären (siehe Tabelle 4, S. 38).

2. Eigenfarbe:

Mit der Umwandlung der Fetttröpfchen in Lipopigmente nehmen auch diese mit zunehmender Versuchsdauer allmählich eine Eigenfarbe an. Nach 48 Stunden zeigen sie eine schwach gelbliche, nach 7 Tagen eine schwach gelb-bräunliche, nach 4 Wochen eine gelb-bräunliche und nach 6 Wochen eine bräunliche und braune Eigenfarbe. In Übereinstimmung mit DAM und GRANADOS 1945, GEDIGK und FISCHER 1958 und 1959, GEDIGK und PIOCH 1965 meinen auch wir, daß es sich bei der Eigenfarbe unserer Pigmentkörnchen um Oxydations- und Polymerisationsprodukte ungesättigter Lipide handelt.

3. Histochemische und färberische Veränderungen:

Synchron mit den fluoreszenzmikroskopischen Befunden und der Zunahme der Eigenfarbe ändern sich auch die histochemischen und färberischen Eigenschaften der Pigmentgranula im Laufe der Versuchsdauer. Im Prinzip unterscheiden sich die nun folgenden Beobachtungen nicht von den Versuchsergebnissen, die GEDIGK und FISCHER 1958 und 1959 und GEDIGK und PIOCH 1965 beschrieben und diskutiert haben.

a) Die Anfärbbarkeit mit Sudan:

Die Fetttröpfchen und Fettpartikel besitzen in unserer Versuchsserie bis zu 10 Stunden eine ausgeprägte Sudanophilie von orange-gelber Farbe. Nach 15, 24 und 48 Stunden ist der Farbton mehr in braun-orange, nach 7 Tagen in gold-braun, nach 4 und 6 Wochen in gold-braun, braun und zum Teil dunkelbraun umgeschlagen (siehe Tabelle 4, S. 38). Dieser abnehmenden Sudanophilie liegt eine Abnahme der Löslichkeit der Pigmentgranula in organischen Lösungsmitteln und damit ein Unvermögen, Sudan zu lösen, zugrunde (GEDIGK und PIOCH 1965).

b) Löslichkeit in organischen Lösungsmitteln:

In dem Maße, in dem die Lipidtröpfchen eine Eigenfarbe gewinnen und ihre Sudanophilie verlieren und sich dadurch in Pigmente umwandeln, nimmt ihre Löslichkeit in organischen Lösungsmitteln ab. Schon nach 48 Stunden haben sich einige Fettpartikel bei der abschließenden Dehydration der Schnitte mit Alkohol und Xylol nicht mehr herausgelöst. Sie erscheinen dann in ihrer Eigenfarbe, die oben zu den verschiedenen Zeitabschnitten beschrieben worden ist. Nach 4 und 6 Wochen sind die Pigmentgranula in organischen Lösungsmitteln nicht mehr löslich. Ebenso wie HASS 1938 (1) und 1938 (2), ENDICOTT 1944, DAM und GRANADOS 1945, CASSELMAN 1951, sowie GEDIGK und FISCHER 1958

und 1959 und GEDIGK und PIOCH 1965 führen auch wir die mit zunehmender Versuchsdauer abnehmende Löslichkeit und schließlich die Unlöslichkeit der Pigmentkörnchen in organischen Lösungsmitteln auf eine fortschreitende Oxydation und Polymerisation der ungesättigten Fettsäuren des Lebertrans zurück.

c) PAS-Reaktion:

Auf den positiven Ausfall der PAS-Reaktion bei Lipiden ist schon im Abschnitt "Methoden" eingegangen worden. Einige Lipidtröpfchen stellen sich nach 1 und 2 Stunden erstmals schwach PAS-positiv dar. Ab 4 Stunden kann man von deutlichen PAS-positiven, rosa und rot angefärbten Partikeln in den Reticulumzellen der roten Milzpulpa sprechen. Die Anzahl der stark PAS-positiven, roten Granula nimmt mit der Versuchsdauer laufend zu und erreicht am Ende unserer Versuchsserie nach 6 Wochen in der Milz ihr Maximum.

d) Prüfung der Säurefestigkeit nach Ziehl-Neelsen:

Erstmals nach 4 Stunden ist ein schwach positiver Ausfall dieser Reaktion an den Fetttröpfchen in den Reticulumzellen der roten Milzpulpa festzustellen. Nach 10, 15, 24 und 48 Stunden ist nur eine geringe Vermehrung des säurefesten Materials zu verzeichnen. Nach 7 Tagen, 4 und 6 Wochen Versuchsdauer stellen sich die zu Pigmenten umgewandelten Granula mit dieser Färbung stark positiv dar. Die unterschiedlich starke Anfärbbarkeit der Lipopigmentpartikel mit Carbol-Fuchsin beruht - wie es bereits von GEDIGK und PIOCH 1965 gezeigt wurde - auf verschiedenen Altersstufen der Pigmentgranula als Folge der mehr oder weniger weit fortgeschrittenen Oxydation und Polymerisation ihrer ungesättigten Fettsäuren. So ist auch zu erklären, warum sich oft bei Fetttröpfchen nur die Oberfläche, d. h. im Schnitt nur der Tröpfchenrand, kräftig

rot dargestellt hat, während das Zentrum ungefärbt bleibt. Gleiche Beobachtungen machten HASS 1938 (1), ENDICOTT 1944 und GEDIGK und FISCHER 1958. Diese Autoren haben gezeigt, daß die Oxydation und Polymerisation der Fettpartikel und Fetttröpfchen an ihrer Oberfläche beginnt und langsam zentrumwärts fortschreitet. Auf diese Weise entstehen zuerst an der Oberfläche der Fetttröpfchen unlösliche, polymerisierte Fettsubstanzen, die dann mit Carbol-Fuchsin rot angefärbt werden können.

Im Prinzip laufen alle Reaktionen an den Pigmentgranula in den reticulo-histiocytären Zellen von Leber und Lunge in gleicher Weise ab. Es bestehen nur geringe Unterschiede hinsichtlich des zeitlichen Ablaufes der Pigmentbildung und der Intensität der jeweiligen Färbungen und Reaktionen. So fallen die PAS- und Ziehl-Neelsen-Reaktion an den Pigmentgranula in den Kupffer'schen Sternzellen und den Histiocyten des portalen Bindegewebes der Leber manchmal etwas stärker aus als in den Reticulumzellen der roten Milzpulpa.

Diese Unterschiede in der Anfärbbarkeit könnten vielleicht von der Größe der Pigmentkörnchen abhängig sein (WOOD und YASUTAKE 1956). Die in den Kupffer'schen Sternzellen gespeicherten schollen- und klumpenartigen Pigmentpartikel sind nämlich deutlich größer als die in den Reticulumzellen der roten Milzpulpa phagocytierten, äußerst feingranulierten Pigmentkörnchen.

Diese Versuchsergebnisse sind in den Tabellen 3, S. 17 und 4, S. 38 schematisch zusammengestellt.

IV. Wie lassen sich diese Veränderungen der färberischen und histochemischen Eigenschaften der Pigmentgranula erklären?

Die Veränderungen der histochemischen und färberischen Eigenschaften der Pigmentkörnchen, nämlich der Verlust der Sekundärfluoreszenz und die gleichzeitige Zunahme der Eigenfluo-

reszenz, die Gewinnung einer Eigenfarbe, der Verlust der Sudanophilie und der Löslichkeit in organischen Lösungsmitteln, die Zunahme der PAS-Positivität und der Säurefestigkeit nach Ziehl-Neelsen, haben GEDIGK und FISCHER 1958 und 1959 und GEDIGK und PIOCH 1965 beschrieben und in Zusammenhang mit einem Alterungsprozeß der Pigmentkörnchen gebracht. Diesem Alterungsprozeß liegt offenbar eine Oxydation und Polymerisation von ungesättigten Fettsäuren zugrunde.

HASS 1938 (2) und 1939 (1) und ENDICOTT 1944 dachten bei diesen Alterungsvorgängen an eine Sauerstoffanlagerung an die Doppelbindungen der ungesättigten Fettsäuren unter Bildung von hochaktiven polymerisierenden Peroxyden. Dementsprechend konnten DAM und GRANADOS 1945 einen Anstieg von Peroxyden nachweisen, welcher der Lipopigmentbildung voraus- und parallel ging. GEDIGK und PIOCH 1965 nehmen an, daß es sich bei der Oxydation hochungesättigter Fettsäuren am ehesten um eine Umwandlung in schwer lösliche cis-trans oder trans-trans konjugierte Polyenhydroperoxyde handelt.

Grundsätzlich kommen für die Oxydation zwei Reaktionsmechanismen in Frage: Eine einfache Autoxydation der Lipide oder eine in der Zelle durch Lipoxydase katalysierte Oxydation (s. bei GEDIGK und PIOCH 1965): Die zahlreichen Versuche, bei denen Lipopigmente mit Hilfe von Lebertran oder reinen ungesättigten Fettsäuren in vitro ohne irgendeinen Zusatz erzeugt worden sind, deuten zunächst auf eine einfache Autoxydation hin (HASS 1938 (2), ENDICOTT 1944, GEDIGK und PIOCH 1965). Andererseits ist es aber auch wahrscheinlich, daß in Geweben und Zellen, in denen Lipoxydase nachgewiesen worden ist, eine durch dieses Ferment gesteuerte Oxydation stattfindet.

TAPPEL 1955 weist darüber hinaus auf die Möglichkeit der Copolymerisation der Polyenfettsäuren mit Proteinen hin. Er konnte quantitativ eine Zunahme der Pigmentmenge pro Zeiteinheit nachweisen, wenn er ungesättigte Fettsäuren mit Hämoglobin zusammenbrachte, und wenn die Fettsäuren und Proteine des Hämoglobins anschließend copolymerisierten. Da aber Lipopigmente auch ohne einen Zusatz von Proteinen in vitro erzeugt werden können, die sämtliche färberischen Eigenschaften der in vivo gebildeten Lipopigmente besitzen, ist die Annahme einer Copolymerisation mit Proteinen zwar möglich, für die Pigmentbildung aber nicht unbedingt notwendig (HASS 1938 (2), ENDICOTT 1944, GEDIGK und PIOCH 1965).

Aufgrund unserer Versuche können wir zu diesen Fragen nicht verbindlich Stellung nehmen. So können bei den durch intravenöse Lebertraninjektion erzeugten Lipopigmenten sowohl eine Autoxydation als auch eine durch Lipoxydase katalysierte Oxydation sowie eine Polymerisation der Oxydationsprodukte in Frage kommen.

V. Änderungen des Pigmentgehaltes in den einzelnen Organen im Laufe der Versuchsdauer

Der Pigmentgehalt war in den einzelnen Organen nicht einheitlich und änderte sich deutlich im Lauf der Versuchszeit.

Nach 7 Tagen, 4 und 6 Wochen trat in den Kupffer'schen Sternzellen der Leber eine Pigmentkonzentration in und in der Umgebung der portalen Felder auf, während die Sternzellen der intermediären und zentralen Läppchenanteile nur noch wenige Pigmentgranula enthielten. Ähnliche Befunde wurden auch schon von POPPER, GYÖRGY und GOLDBLATT 1944 bei der experimentellen, diätetischen Lebercirrhose und von THOMPSON, FOX, THOMASSEN und FORBES 1960 nach intravenöser Applikation einer Fettemulsion erhoben. Ganz entsprechend konnten wir ebenfalls eine Zunahme der Pigmentmenge in den Kupffer'schen Sternzellen und Histiocyten der portalen Felder bis zu 7 Tagen nach Injektion der Lebertranemulsion feststellen.

In den Alveolarepithelien und Histiocyten des interstitiellen Bindegewebes der Lunge ließen sich 10 Stunden nach erfolgter Injektion der Lebertranemulsion erstmals Lipopigmente nachweisen. Die Menge der Pigmentgranula nahm in den oben beschriebenen Zellen bis einschließlich 48 Stunden nach erfolgter Lebertranapplikation zu.

Auffallend war dann eine deutliche Verminderung der Pigmentmenge nach 6 Wochen in der Lunge und vor allem in der Leber. Dieser Pigmentschwund deutete sich schon nach 4 Wochen in beiden Organen an. Im gleichen Zeitraum nahm der Pigmentgehalt der Milz dagegen noch erheblich zu.

Tabelle 5

Pigmentgehalt von Leber und Milz nach verschiedenen Zeitabschnitten:

Zeit	Leber (Sternzellen)	Milz (Reticulumzellen)
5'		
10'		
30'		
60'		
2 h		
4 h	(+)	(+)
10 h	+	+
15 h	+	+
24 h	++	++
48 h	++	++
7 Tg.	+++	+++
4 Wo.	++	+++
6 Wo.	+	++++

Diese Pigmentverschiebungen im Organismus, in unserem Falle von Lunge und Leber in die Milz, wurde auch von THOMPSON, FOX, THOMASSEN und FORBES 1960 bei Ratten beobachtet. Sie konnten nach intravenöser Injektion einer Baumwollsaatöl-Emulsion nach 3 Monaten nur noch wenig, nach 6 Monaten praktisch kein Pigment mehr in den Kupffer'schen Sternzellen der Leber nachweisen. Zu diesen Zeiten zeigten die Reticulumzellen der roten Milzpulpa einen ausgeprägten Pigmentbefall. Nach 12 und 18 Monaten war aber auch aus der Milz das Pigment geschwunden und trat nun in den mesenterialen Lymphknoten auf.

Zu ähnlichen Ergebnissen gelangten auch SCHOENBERG, GILMAN, MUMAW und MOORE 1963 nach intravenöser Injektion von Latexpartikeln. Sie konnten einwandfrei eine Verschiebung der

Latexpartikel aus Lunge und Leber in die Milz nach längeren Zeitintervallen morphologisch nachweisen. In der gleichen Weise, wie sich der Gehalt an Latexpartikeln in Lunge und Leber verminderte, nahm die Menge der Latexpartikel in der Milz zu.

Die Ursache für den Transport von partikelförmigen Fremdkörpern, und zwar von Lipopigmenten oder Latexpartikeln, im Organismus von den reticulo-histiocytären Zellen eines Organes in die entsprechenden Zellen eines anderen Organes lassen sich zur Zeit noch nicht klären.

VI. Welchem Typ der Lipopigmente ist unser durch intravenöse Lebertranzufuhr erzeugtes Pigment zuzuordnen?

Morphologisch, histochemisch und elektronenmikroskopisch lassen sich zwei Arten von Lipopigmenten voneinander abgrenzen. Erstens das in zur Phagocytose befähigten Zellen (Makrophagen und reticuloendotheliale Elemente) auftretende Ceroid; zweitens die in Muskelfasern und epithelialen Zellen vorkommenden Lipopigmente, die als Lipofuscine und Vitamin E-Mangelpigment bekannt sind (GEDIGK 1958, GEDIGK und FISCHER 1958).

Das Ceroid entsteht in der Regel durch einen einmaligen Phagocytose-Vorgang von Fettstoffen, die von den phagocytierenden Zellen im Übermaß von außen aufgenommen werden. Dabei kann es sich um körpereigene (GEDIGK und FISCHER 1958, HARTROFT 1951) oder auch um körperfremde Fettstoffe (GEDIGK und PIOCH 1965) handeln, aus denen im Laufe der Zeit Pigmente entstehen.

Die Lipofuscine bilden sich demgegenüber durch allmähliche Anhäufung von ungesättigten Fettsäuren in stoffwechselaktiven, enzym- und eiweißhaltigen Cytoplasmabezirken von Muskelfasern und epithelialen Zellen, in deren Bereich ihre Umwandlung in Pigmentgranula erfolgt (GEDIGK 1958, GEDIGK und FISCHER 1959, GEDIGK und WESSEL 1964).

Aufgrund unserer Befunde unterliegt es keinem Zweifel, daß es sich bei dem durch intravenöse Injektion von Lebertran erzeugten Pigment, welches wir mit unseren licht- und fluoreszenzmikroskopischen Methoden nur in Zellen des Reticulo-Histiocytären Systems nachweisen konnten, um Ceroid handelt.

Feine Pigmentniederschläge in epithelialen Zellelementen, wie es NEGLIA, BURROWS, THOMPSON II und SCHAFFNER 1963 nach intravenöser Fettzufuhr beschrieben haben, konnten wir bei unseren Experimenten nicht beobachten. Diese Tatsache bedarf noch einer Klärung, denn es ist merkwürdig, daß die nach der intravenösen Injektion der Lebertranemulsion in Parenchymzellen, und zwar besonders in Leberzellen auftretenden Fetttröpfchen - trotz der zunächst gleichen chemischen Beschaffenheit wie die Fettpartikel in den reticulo-histiocytären Zellen - nicht in Pigmente umgewandelt, sondern offenbar abgebaut werden.

VII. Die Verfettungsformen der übrigen Organe

Eine ausführliche Diskussion der Fettablagerungen in anderen Organen würde über den Rahmen dieser Arbeit hinausgehen. Daher sollen hier nur die einzelnen Charakteristika der Verfettungsformen dargelegt werden.

1. Milz: Die Verfettungsform der Milz ist schon ausführlich diskutiert worden (siehe S. 42 - 43).

2. Leber: Nach 5, 10 und 30 Minuten stellen sich hauptsächlich die Parenchymzellen der peripheren Läppchenanteile verfettet dar. Nach 1 Stunde breitet sich die Verfettung über das gesamte Läppchen aus, wobei es zum Bild der diffusen Leberläppchenverfettung mit peripherer und intermediärer Betonung kommt.

   Die anfangs perivasale und perinukleäre Verfettung der Leberzellen geht dabei von 4 Stunden an in eine diffuse Verfettung des Cytoplasmas über. Auch die Fetttröpfchengröße ändert sich

im Laufe der Versuchsdauer. So sind die Leberzellen nach 5, 10, 30, 60 Minuten, 2 und 4 Stunden feintropfig, nach 10 und 15 Stunden mittelgroßtropfig und nach 24 und 48 Stunden großtropfig verfettet. Nach 7 Tagen ist in den Leberzellen Fett nicht mehr nachweisbar.

In den Kupffer'schen Sternzellen lassen sich schon nach 5 und 10 Minuten Fetttröpfchen nachweisen, die sich im Laufe der Versuchsdauer nach 10, 15 und 24 Stunden in Granula und nach 48 Stunden, 7 Tagen, 4 und 6 Wochen in Lipopigmente umwandeln.

Als Ursache der Leberverfettung sind hauptsächlich drei Möglichkeiten in Betracht zu ziehen:
a) Steatosis saginativa
b) Steatosis retentiva
c) Steatosis regressiva

Für die bei unseren Experimenten erzeugte Verfettungsform der Leber, die peripher beginnt und sich zentralwärts ausbreitet, kommt besonders die Steatosis saginativa in Frage (KAUFMANN 1958, S. 976 und 978, POPPER 1961, S. 281 und 569, KIEF 1964). Gleichermaßen muß man auch eine Steatosis retentiva in Betracht ziehen, da die massive Lipämie bis 2 Tage nach Versuchsbeginn nachweisbar war. Die Leberzellverfettung, die zuerst als direkte Folge der Lipämie zu deuten ist, könnte bei anhaltend starker Lipämie durch Überschreiten der Fermentkapazität der einzelnen Leberzelle vielleicht auch in eine Retentionsverfettung übergehen. Wahrscheinlich spielen beide Faktoren hinter- und/oder nebeneinander eine Rolle. Auch eine Steatosis regressiva kann nicht völlig ausgeschlossen werden, da einige Autoren dem Lebertran eine Gewebstoxizität zuschreiben, die HASS 1938 (1) im subcutanen Gewebe, PINKERTON 1928 und GRAEF, KAUFMANN, KAPLAN 1938 in der Lunge und GYÖRGY und GOLDBLATT (zitiert bei KAUFMANN 1958, S. 936 - 940) in der Leber nachweisen konnten. In die gleiche Richtung deuten auch unsere peripheren und zum Teil intermediären Leberläppchennekrosen, zumal diese in den Läppchenanteilen auftraten, in denen auch die Verfettung am stärksten ausgeprägt war. Da periphere Leberläppchennekrosen bei Phosphor- und Pilzvergiftungen und ganz allgemein bei Toxinämien (POPPER 1961, S. 228) auftreten, sie andererseits aber auch durch gleichzeitige Injektion von Öl in die Äste der Leberarterie und Pfortader experimentell erzeugt werden konnten (POPPER 1961, S. 228), möchten auch wir annehmen, daß die peripheren und zum Teil intermediären Leberläppchennekrosen durch einen toxischen Faktor des Lebertrans bedingt sind.

3. Lunge: In Übereinstimmung mit MURRAY und FREEMAN 1951 und SCHUBERT und KRÜGER 1962, die stabile Fettemulsionen intravenös injiziert hatten, stellten auch wir eine Verfettung der Histiocyten des Lungengewebes und ganz besonders der Alveolarepithelien fest.

Wenn man weiter an die Arbeiten von SCHRADE und BIEGLER 1956, RUDOLF und LENNARTZ 1960 und BUCKINGHAM, HEINEMANN, SOMMERS und McNARY 1966 denkt, die eine aktive Teilnahme der Lunge am Fettstoffwechsel und sogar ein bestimmtes Enzymprofil der Alveolarepithelien für Fette nachweisen konnten, ist es nicht verwunderlich, daß die Lunge an der Fettspeicherung und Fettverarbeitung nach intravenöser Fettzufuhr teilnimmt.

4. Niere: 15 Stunden nach intravenöser Injektion der Lebertranemulsion tritt zum ersten Mal an der Basis der Hauptstückepithelien feintropfiges Fett auf. Die Verfettung verstärkt sich nach 24 und 48 Stunden, wobei auch die Größe der Lipidtröpfchen zunimmt. So sind nach 24 Stunden die Hauptstückepithelien hochgradig verfettet. Nach 48 Stunden sind auch zahlreiche feine Fetttröpfchen in den Tubuluslumina anzutreffen. Während der Versuchsdauer bis 48 Stunden besteht dabei in den Nierengefäßen und in den Glomerula eine feintropfige Lipämie. In der Bowman'schen Kapsel dagegen konnten Fetttröpfchen nicht sicher nachgewiesen werden.

Da heute die Ansicht vorherrscht, daß Fettstoffe in der Niere glomerulär in Verbindung mit Eiweiß sezerniert werden, ist an sich die Annahme einer Permeabilitätsstörung der glomerulären Basalmembran naheliegend (ZOLLINGER 1966, S. 234). Eine solche Permeabilitätsstörung könnte zwei Gründe haben: Erstens könnte die veränderte Blutzusammensetzung infolge der massiven Lipämie die Basalmembran schädigen; und zweitens könnten kurzzeitige Kapillarverschlüsse durch kleine Fettembolien, die SCHUBERT und KRÜGER (1962) nach intravenöser Fettapplikation beobachtet haben, zu einer

vorübergehend vermehrten Durchlässigkeit und damit zu einer Funktionsstörung der glomerulären Basalmembran führen. In diesen Fällen würde es sich bei den Fetttröpfchen in den Tubulusepithelien also um Lipide handeln, welche durch die Glomerula hindurchgetreten und aus den Lumina der Tubuli von den Epithelzellen rückresorbiert worden sind.

Andererseits kann aber die Möglichkeit nicht mit der letzten Sicherheit ausgeschlossen werden, daß die Lipidtröpfchen aus den Lichtungen der peritubulären Kapillaren, in denen - wie bereits betont - eine deutliche Lipämie besteht, von den Tubulusepithelien der Hauptstücke direkt aufgenommen und dann in die Lichtungen der Tubuli abgegeben worden sind.

Aufgrund unserer Versuchsanordnung kann dieses Problem noch nicht geklärt werden, d. h. es muß vorerst noch die Frage offen bleiben, ob es sich bei der Verfettung der Hauptstückepithelien um rückresorbierte Lipide handelt, die vorher die Basalmembran der Glomerula passiert haben, oder ob die Fettablagerungen aus den peritubulären Kapillaren in die Tubulusepithelien gelangt sind.

5. Herz und Gehirn: In beiden Organen konnten wir keine Verfettung der Parenchym- und interstitiellen Zellen feststellen. Zu allen Versuchszeiten - bis einschließlich 48 Stunden - bestand in den Gefäßen dieser Organe nur eine feintropfige Lipämie.

E. Zusammenfassung.

Durch eine einmalige intravenöse Injektion einer Lebertranemulsion kommt es zunächst zu einer Lipämie und zu einer Ablagerung von Fetttröpfchen in verschiedenen Organen und Zellen. Diese Fetttröpfchen werden dann allmählich im Cytoplasma von reticulo-histiocytären Zellen der Leber, Milz und Lunge in

Lipopigmente umgewandelt, die in allen wesentlichen fluoreszenzmikroskopischen und histochemischen Eigenschaften mit dem Ceroid übereinstimmen.

Mit zunehmender Versuchsdauer ändern sich die fluoreszenzmikroskopischen und histochemischen Eigenschaften der Lipidtröpfchen bzw. der Pigmentkörnchen: Dabei nehmen ihre Astraphosphinfluoreszenz, Sudanophilie und Löslichkeit in organischen Lösungsmitteln ab, ihre Eigenfluoreszenz, Eigenfarbe (gelbbraun), PAS-Positivität und Säurefestigkeit nach Ziehl-Neelsen dagegen zu.

Diesem Umwandlungsprozeß der Fetttröpfchen zu Lipopigmenten, den man mit fluoreszenz- und lichtmikroskopischen Methoden verfolgen kann, liegt eine zunehmende Oxydation und Polymerisation der ungesättigten Fettsäuren des Lebertranes zugrunde.

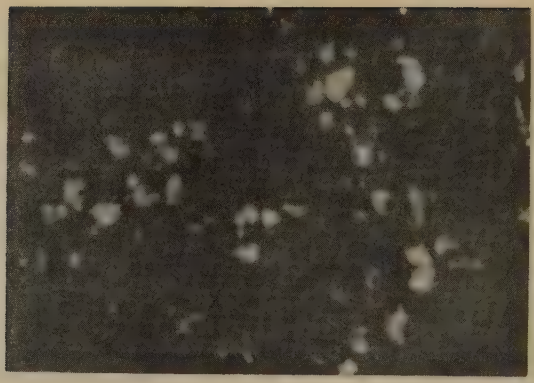

Abb. I (Nr. 97): Eigenfluoreszenz. Milz. Nach 6 Wochen.
Eigenfluoreszierende Lipopigmentgranula in den Reticulumzellen der roten Pulpa
Vergr.: 312fach

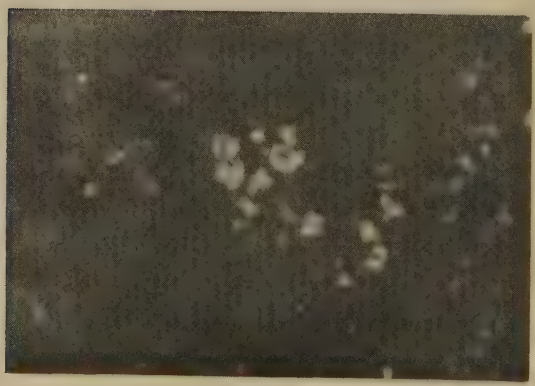

Abb. II (Nr. 98): Eigenfluoreszenz. Milz. Nach 6 Wochen.
Eine Gruppe von Reticulumzellen, die Lipopigmente gespeichert haben. Zellkerne ausgespart!
Vergr.: 312fach

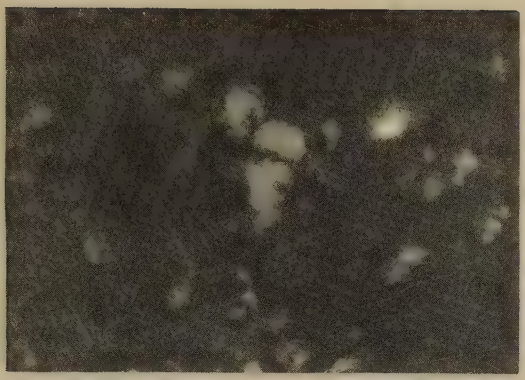

Abb. III (Nr. 99): Eigenfluoreszenz. Milz. Nach 6 Wochen.
Lipopigmentgranula im Cytoplasma zahlreicher Reticulumzellen der roten Pulpa.
Vergr.: 500fach

Abb. IV (Nr. 110): Eigenfluoreszenz. Leber. Nach 6 Wochen.
Eigenfluoreszierende Lipopigmentgranula in zu einer Gruppe angeordneten Kupffer'schen Sternzellen.
Vergr.: 500fach

Literaturverzeichnis

(1) ASHWORTH, C.T., N.R. di LUZIO, S.J. RIGGI: A morphologic study of the effect of reticuloendothelial stimulation upon hepatic removal of minute particles from the blood of rats.
Exp. molecul. Path. 1, 83 - 103 (1963).

(2) BJÖRKERUD, S.: Studies of lipofuscin granules of human cardiac muscle. II. Chemical analysis of the isolated granules.
Exp. molecul. Path. 3, 377 - 389 (1964).

(3) BJÖRKERUD, S., U. SCHELIN: Liver changes in ceroid storage disease in childhood.
Acta path. microbiol. Scand. 60, 512 - 522 (1964).

(4) BUCKINGHAM, S., H.O. HEINEMANN, S.C. SOMMERS, W.F. McNARY: Phospholipid synthesis in the large pulmonary alveolar cells. Its relation to lung surfactants.
Am. J. Path. 48, 1027 - 1041 (1966).

(5) CASSELMAN, W.G.B.: The in vitro preparation and histochemical properties of substances resembling ceroid.
J. exp. med. 94, 549 - 562 (1951).

(6) CASSELMAN, W.G.B.: Factors influencing the formation of ceroid in the livers of choline-deficient rats.
Biochem. and biophys. acta 11, 445 - 447 (1953).

(7) DAM, H.: Studies on vitamin E-deficiency in chicks.
J. Nutr. 27, 193 - 211 (1944).

(8) DAM, H., H. GRANADOS: Role of unsaturated fatty acids in changes of adipose and dental tissues in vitamin E-deficiency.
Science 102, 327 - 328 (1945).

(9) DAM, H., H. GRANADOS: Peroxidation of body fat in vitamin E-deficiency.
Acta physiol. Scand. 10, 162 - 171 (1945).

(10) DEBUCH, H., M. CLARA: Handbuch der Histochemie, Band V, 1. Teil, Gustav Fischer Verlag, Stuttgart 1965.

(11) ELSTER, K.: Morphologisches Bild bei Fettinfusionen.
Med. u. Ernähr. 4, 61 - 67 (1963).

(12) ENDICOTT, K.M.: Similarity of the acid-fast pigment ceroid and oxidized unsaturated fat.
Arch. Path. 37, 49 - 53 (1944).

(13) ENDICOTT, K.M., R.D. LILLIE: Ceroid, the pigment of dietary cirrhosis of rats, its characteristics and its differentiation from hemofuscin.
Am. J. Path. 20, 149 - 153 (1944).

(14) FLASCHENTRÄGER, B.: Physiologische Chemie, ein Lehr- und Handbuch für Ärzte, Biologen und Chemiker, 1. Band: Die Stoffe.
Springer Verlag, Berlin-Göttingen-Heidelberg 1951

(15) GEDIGK, P.: Histochemische Darstellung von Kohlenhydraten.
Klin. Wschr. 30, 1057 - 1065 (1952).

(16) GEDIGK, P.: Zur Kenntnis lipogener Pigmente.
Verh. dtsch. Ges. Path. 42, 430 - 434 (1958).

(17) GEDIGK, P., E. BONTKE: Über den Nachweis von hydrolytischen Enzymen in Lipopigmenten.
Z. Zellforsch. 44, 495 - 518 (1956).

(18) GEDIGK, P., E. BONTKE: Zur Genese der Lipopigmente.
Verh. dtsch. Ges. Path. 40, 244 - 247 (1956)

(19) GEDIGK, P., R. FISCHER: Über die Entstehung des Ceroidpigmentes bei der hämorrhagischen Fettgewebsnekrose.
Virch. Arch. path. Anat. 331, 341 - 370 (1958).

(20) GEDIGK, P., R. FISCHER: Über die Entstehung von Lipopigmenten in Muskelfasern. Untersuchungen beim experimentellen Vitamin E-Mangel der Ratte und an Organen des Menschen.
Virch. Arch. path. Anat. 332, 431 - 468 (1959).

(21) GEDIGK, P., W. PIOCH: Über die formale Genese lipogener Pigmente. Untersuchungen mit Estern hochungesättigter Fettsäuren.
Virch. Arch. path. Anat. 339, 100 - 135 (1965).

(22) GEDIGK, P., V. TOTOVIĆ: Histochemische Methoden.
In: Biochem. Taschenbuch, 2. Teil, S. 437 - 494.
Berlin-Göttingen-Heidelberg: Springer 1964.

(23) GEDIGK, P., W. WESSEL: Elektronenmikroskopische Untersuchung des Vitamin E-Mangelpigmentes im Myometrium der Ratte.
Virch. Arch. path. Anat. 337, 367 - 382 (1964).

(24) GEYER, R.P., G.V. MANN, J. YOUNG, T.D. KINNEY, F.J. STARE: Parenteral nutrition. Studies on soybean phosphatides as emulsifiers for intravenous fat emulsions.
J. Lab. Clin. Med. 33, 163 - 174 (1948).

(25) GEYER, R.P., D.M. WATKIN, L.W. MATHEWS, F.J. STARE: Parenteral nutrition. Studies with stable and unstable emulsions administered intravenously.
Proceed. society exp. Biol. Med. 77, 872 - 876 (1951).

(26) GRAEF, I.: Pulmonary reactions to aspirated lipids.
Arch. Path. 24, 122 - 125 (1937).

(27) GRAEF, I.: Studies in Lipid Pneumonia. Lipid Pneumonia due to cod-liver oil.
Arch. Path. 28, 613 - 667 (1939).

(28) GRAEF, I., W. KAUFMANN, L. KAPLAN: Experimental studies of tissue reactions to lipids: The formation of acid-fast membranes around certain oils and waxes.
Arch. Path. 26, 914 - 916 (1938).

(29) GRIEM, W.: Ablagerung von Lipidmaterial in der Niere bei Ratten nach Verfütterung von autoxydierten Fetten.
Virch. Arch. path. Anat. 336, 592 - 598 (1963).

(30) HARTROFT, W.S.: In vitro and in vivo production of ceroid-like substances from erythrocytes and certain lipids.
Science 113, 673 - 674 (1951).

(31) HASS, G.M.: (1) Tissue reactions to natural oils and fractions thereof.
Arch. Path. 26, 956 - 965 (1938).

(32) HASS, G.M.: (2) Intercellular transformations of unsaturated fatty acids and esters. An experimental study.
Arch. Path. 26, 1196 - 1207 (1938).

(33) HASS, G.M.: (1) Formation at lipoid-aqueous interfaces in tissues.
Arch. Path. 27, 15 - 24 (1939).

(34) HASS, G.M.: (2) Membrane formation at lipoid-aqueous interfaces in tissues.
Arch. Path. 28, 177 - 198 (1939).

(35) HOLT, L.E., H.C. TIDWELL, T.F. McNAIR SCOTT: The intravenous administration of fat.
J. Pediat. 6, 151 - 160 (1935).

(36) HOWES jr., E.L., H.M. PRICE, J.M. BLUMBERG: The effects of a diet producing lipochrome pigment (ceroid) on the ultrastructure of skeletal muscle in the rat.
Am. J. Path. 45, 599 - 631 (1964).

(37) JAFFE, R.H., S.L. BERMAN: The relations between Kupffer-Cells and liver cells.
Arch. Path. 5, 1020 - 1027 (1928).

(38) KAUFMANN, E.: Lehrbuch der speziellen pathologischen Anatomie. 11. und 12. Auflage, Band I, 1. Hälfte, Walter de Gruyter Verlag, Berlin 1955.

(39) KAUFMANN, E.: Lehrbuch der speziellen pathologischen Anatomie. 11. und 12. Auflage, Band II, 2. Teil. Walter de Gruyter Verlag, Berlin 1958.

(40) KIEF, H.: Studien zur Morphologie des Neutralfettstoffwechsels.
Georg Thieme Verlag, Stuttgart 1964.

(41) LAPERROUZA, C.A.: Zwei Fälle von Ceroidpigmentierung des Mesenterialfettes und der glatten Muskulatur mit schwerer pseudoperniziöser Anämie bei Parkinsonismus.
Virch. Arch. path. Anat. 335, 544 - 555 (1962).

(42) LILLIE, R.D., L.L. ASHBURN, W.H. SEBRELL, F.S. DAFT, J.V. LOWRY: Histogenesis and repair of the hepatic cirrhosis in rats produced on low protein diets and preventable with choline.
Pub. Health Rep. 57, 502 - 508 (1942).

(43) MALKOFF, D.B., B.L. STREHLER: The ultrastructure of isolated and in situ human cardiac age pigment (Lipofuscin).
J. Cell Biol. 16, 611 - 616 (1963).

(44) MANN, G.V., R.P. GEYER, D.M. WATKIN, R.L. SMYTHE, D. DJU, N. ZAMCHECK, F.J. STARE: Parenteral nutrition. Metabolic studies on puppies infused with fat emulsions.
J. Lab. Clin. Med. 33, 1503 - 1522 (1948).

(45) MANN, G.V., R.P. GEYER, D.M. WATKIN, F.J. STARE: Fat emulsions for intravenous nutrition in man.
J. Lab. Clin. Med.34, 699 - 712 (1949).

(46) MASON, K.E., H. DAM, H. GRANADOS: Histological changes in adipose tissue of rats fed a vitamin E-deficient diet high in cod-liver oil.
Anat. Rec. 94, 265 - 287 (1946).

(47) McKIBBIN, J.M., R.M. FERRY, F.J. STARE: Parenteral nutrition. The utilization of emulsified fat given intravenously.
J. Clin. Invest. 25, 679 - 686 (1946).

(48) MEIER-RUGE, W., P. EBERT: Die Verfettungsformen der menschlichen Leber und ihre Ätiologie.
Verh. dtsch. Ges. Path. 46, 220 - 223 (1962).

(49) MENG, H.C.: A fat emulsion for intravenous nutrition in rabbits.
J. Lab. Clin. Med. 37, 222 - 228 (1951).

(50) MENG, H.C.: Lipid Transport. Charles C. Thomas, Springfield-Illinois, U.S.A. 1964.

(51) MENG, H.C., F. EARLY: Study of complete parenteral alimentation on dogs.
J. Lab. Clin. Med. 34, 1121 - 1132 (1949).

(52) MENG, H.C., S. FREEMAN: Experimental studies on the intravenous injection of a fat emulsion into dogs. J. Lab. Clin. Med. 33, 689 - 707 (1948).

(53) MEYER, C.E., J.A. FANCHER, P.E. SCHURR, H.D. WEBSTER: Composition, preparation and testing of an intravenous fat emulsion. Metabolism 6, 591 - 596 (1957).

(54) MOORE, R.D., V.R. MUMAW, M.D. SCHOENBERG: The structure of the spleen and its functional implications. Exp. molecul. Path. 3, 31 - 50 (1964).

(55) MURRAY, R.G., S. FREEMAN: The morphologic distribution of intravenously injected fatty chyle and artificial fat emulsion in rats and dogs. J. Lab. Clin. Med. 38, 56 - 69 (1951).

(56) NEGLIA, W., L. BURROWS, S.W. THOMPSON II, F. SCHAFFNER: Ultrastructural studies of hepatic pigment following administration of intravenous fat. Lab. Invest. 12, 378 - 385 (1963).

(57) PEARSE, A.G.E.: Histochemistry. Theoretical and applied. London: Churchill 1953.

(58) PINKERTON, H.: The reaction to oils and fats in the lung. Arch. Path. 5, 380 - 401 (1928).

(59) POPPER, H.: Histologic distribution of Vitamin A in human organs under normal and under pathologic conditions. Arch. Path. 31, 766 - 802 (1941).

(60) POPPER, H., F. SCHAFFNER: Die Leber: Struktur und Funktion. Georg Thieme Verlag, Stuttgart 1961.

(61) POPPER, H. P., GYÖRGY, H. GOLDBLATT: Fluorescent material (ceroid) in experimental nutritional cirrhosis. Arch. Path. 37, 161 - 168 (1944).

(62) PORTA, E.A.: Experimental electron microscopic study of the sequential stages of in vitro formation of ceroid. Exp. molecul. Path. 2, 219 - 233 (1963).

(63) REES, K.R., V.L. SHOTLANDER: Changes in lipid metabolism during the developement of the fatty liver. Brit. J. exp. Path. 45, 364 - 374 (1964).

(64) ROMEIS, B.: Mikroskopische Technik. München, Leipnitz-Verlag 1948.

(65) RUDOLF, G., K.J. LENNARTZ: Experimentelle Untersuchungen zum Fettstoffwechsel der Lunge. Verh. dtsch. Ges. Path. 44, 166 - 171 (1960).

(66) SCHOENBERG, M.D., P.A. GILMAN, V.R. MUMAW, R.D. MOORE: Proliferation of the reticuloendothelial system and phagocytosis.
Exp. molecul. Path. 2, 126 - 143 (1963).

(67) SCHÖN, H., F. WOLF, W. ZELLER, G. KLEYENSTEIBER: Untersuchungen über den Abtransport einer intravenös zugeführten Fettemulsion.
Med. Klin. 58, 1296 - 1301 (1963).

(68) SCHRADE, W., R. BIEGLER: Weitere Untersuchungen über die Beteiligung der Lungen am Fettstoffwechsel.
Klin. Wschr. 34, 1247 - 1251 (1956).

(69) SCHUBERT, G.E., G.A. KRÜGER: Morphologische Befunde nach parenteraler Zufuhr feintropfiger Fettemulsionen.
Zeitschr. ges. exp. Med. 135, 505 - 523 (1962).

(70) SCHULZ, H., J. WEDELL: Elektronenmikroskopische Untersuchungen zur Frage der Fettphagocytose und des Fetttransportes durch Thrombocyten.
Klin. Wschr. 40, 1114 - 1120 (1962).

(71) SHAFIROFF, B.G.P., H. BARON, E. ROTH: Intravenous infusions of combined fat emulsion into dogs.
Proc. Soc. exp. Biol. Med. 69, 387 - 391 (1948).

(72) SINAPIUS, D., R.D. GUNKEL: Über Ceroid bei Arteriosklerose.
Verh. dtsch. Ges. Path. 47, 373 - 377 (1963).

(73) TAPPEL, A.L.: Studies of the mechanism of vitamin E action. III. In vitro copolymerisation of oxidized fats with protein.
Arch. Biochem. 54, 266 - 280 (1955).

(74) THOMPSON, S.W., A.L. FORBES, F.B. JOHNSON: Staining characteristics of a pigment associated with intravenous fat alimentation.
Lab. Invest. 7, 533 - 543 (1958).

(75) THOMPSON, S.W., M.A. FOX, M. HARRISON, A.L. FORBES: Influence of fixatives, solvents, and bleaches on intravenous fat pigment.
Lab. Invest. 9, 216 - 227 (1960).

(76) THOMPSON, S.W., M.A. FOX, R.W. THOMASSEN, A.L. FORBES: Residual pigment associated with intravenous fat alimentation.
Am. J. Path. 36, 355 - 363 (1960)

(77) THOMPSON, S.W., R.W. THOMASSEN, D.H. YOST, M.A. FOX, R.G. WIEGAND: A Study on pigment deposition by intravenous fat emulsions.
J. Nutr. 71, 37 - 44 (1960).

(78) WADDELL, W.R., R.P. GEYER, I.M. SASLAW, F.J. STARE: Normal disappearance curve of emulsified fat from the blood stream and some factors which influence it. Am. J. Physiol. 174, 39 - 42 (1953).

(79) WADDELL, W.R., R.P. GEYER, E. CLARKE, F.J. STARE: Role of various organs in the removal of emulsified fat from the blood stream. Am. J. Physiol. 175, 299 - 302 (1953).

(80) WEISS, L.: The white pulp of the spleen. The relationship of arterial vessels, reticulum and free cells in the periarterial lymphatic sheath. Bull. Johns Hopkins Hospital 115, 99 - 173 (1964).

(81) WOOD, E.M., N.T. YASUTAKE: Ceroid in fish. Am. J. Path. 32, 591 - 603 (1956).

(82) ZOLLINGER, H.U.: Lokalisation und Bedeutung des Ceroid-pigmentes. Schweiz. Z. allg. Path. 16, 1026 - 1040 (1953).

(83) ZOLLINGER, H.U.: Niere und ableitende Harnwege. In: Doerr, Uehlinger: Spez. patholog. Anatomie, Band III, Springer Verlag, Berlin-Heidelberg-New York 1966.

L e b e n s l a u f

Am 22. Januar 1940 wurde ich als Sohn des Reg.-Bauamtmanns Heinrich Wilhelm und seiner Ehefrau Elfriede Wilhelm, geb. Eltze, in Arolsen/Waldeck geboren. Dort besuchte ich von 1946 bis 1950 die Volksschule und anschließend das Christian-Rauch-Gymnasium von 1951 bis 1953. Die weitere Schulausbildung erfolgte an der Wilhelmschule in Kassel. Dort legte ich am 3. März 1960 das Abitur ab.

Im Sommersemester 1960 begann ich mein Medizinstudium an der Philipps-Universität in Marburg, legte dort nach zwei Semestern das Vorphysikum und nach weiteren drei Semestern das Physikum ab. Nach meinem ersten klinischen Semester wechselte ich an die Christian-Albrechts-Universität in Kiel über und studierte dort im Sommersemester 1963. Danach kehrte ich wieder für die weiteren klinischen Semester nach Marburg zurück und meldete mich dort im Juli 1965 zum Staatsexamen, welches ich am 18. März 1966 beendete.

Meine Medizinalassistentenzeit begann ich am Pathologischen Institut der Universität Marburg, wo ich vom 1. April bis zum 30. September 1966 tätig war. Anschließend setzte ich meine klinische Ausbildung als Medizinalassistent am Städtischen Krankenhaus Elmshorn auf der internen, chirurgischen und gynäkologisch-geburtshilflichen Abteilung fort.

Meine akademischen Lehrer waren die Herren Professoren und Dozenten

in M a r b u r g :
Beckmann, Berendes, Bommer, Braun-Falco, Brück, Bücher, Dimroth, Dölle, Drawert, Exner, Gedigk, Golenhofen, Hamm, Hensel, Heuser, Hildebrandt, Huber, Jacob, Lang, Linneweh, Mahr, Mann, Martini, Mattes, Marx, du Mesnil, Neubauer,

Niessing, Overbeck, Petry, Rodeck, Rohen, Sauer, Schiff, Schleyer, Schmid, Schölmerich, Schultze, Schwaiger, Seidel, Siegert, Siess, Straub, Streicher, Vogt, Walcher, Wendt, Würterle,

in K i e l :
Bernsmeier, Drube, Gottstein, Huber, Lennert, Portwich, Remmele, Seusing, Ule.